

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Utilidad de la determinación periódica de la  
concentración intracelular de adenosina  
trifosfato (iATP) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>  
estimulados con fitohemaglutinina para la  
predicción de complicaciones infecciosas en  
receptores de trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**María Asunción Pérez-Jacoiste Asín**

DIRECTORES

**Francisco López Medrano**  
**Rafael San Juan Garrido**  
**José María Aguado García**

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**



**Utilidad de la determinación periódica de la concentración intracelular de adenosina trifosfato (iATP) en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina para la predicción de complicaciones infecciosas en receptores de trasplante renal**

**TESIS DOCTORAL**

**María Asunción Pérez-Jacoiste Asín**

***Directores de tesis:***

Francisco López Medrano

Rafael San Juan Garrido

José María Aguado García

“El conocimiento del enfermo no se obtiene por una suma de datos recogidos por el clínico y el analista. El conocimiento del enfermo depende, siempre, de un proceso inteligente y cordial, en el que el médico ha de ponerse en contacto profundo con el enfermo”

Gregorio Marañón

“El mayor error es no hacer nada  
por miedo a equivocarnos”

P. Arrupe

A los receptores de un trasplante renal, para que los resultados de esta tesis  
contribuyan a mejorar su calidad de vida

## **Agradecimientos**

Esta tesis, además de suponer un paso más en mi formación, me brinda la oportunidad de agradecer por escrito la ayuda que he recibido de tantas personas para crecer como persona y como médico.

A mis padres porque me lo habéis dado todo, por vuestro amor incondicional, por estar siempre ahí, por apoyarme en todas mis decisiones aunque a veces os haya resultado difícil, por el acto de generosidad tan grande que supone ser padres. A Isabel, porque me entiendes sin explicarte nada, por todo lo que hemos compartido, por ser tan buena, por todas las noches que sin rechistar te dormías con la luz encendida para que yo estudiara cuando compartíamos cuarto. A Javier, por tus consejos, por buscar mi opinión ante las decisiones importantes de la vida, porque admiro tu capacidad. Por ser los mejores padres y hermanos del mundo y porque os quiero mucho.

A Adolfo, porque siempre confías en tu prima médico para que resuelva las patologías banales que tienes de vez en cuando. Por lo bien que te portas siempre con nosotros, por ser como un hermano más. A la tía Pilarin por mimarnos, por preocuparte siempre por nosotros y por querernos tanto. A M<sup>a</sup> Carmen, por querer siempre lo mejor para mí, por ser mi madrina adoptiva. A toda mi familia, por todas las horas que no os he dedicado, por el trabajo, por esta tesis, porque la vida corre muy deprisa. Porque, aunque en la distancia, siempre os tengo presentes.

A todos los profesores que me han enseñado. A mi profesor de Física y Química del colegio Antonio Cutrín, porque con mi primer suspenso me retó para superarme. A mis profesores de Patología General en la Universidad de Navarra, Jorge Quiroga y Jesús Prieto, por transmitirme la pasión por la Medicina Interna. A mi maestro, Santiago Prieto, por enseñarme a ser Médico. A mis coerres, porque hemos caminado de la mano estos años, por lo que hemos estudiado y aprendido juntos (aún me acuerdo cuando quedábamos de R1 para estudiar cosas tan importantes en la vida de un internista como el manejo del estreñimiento), por las risas que hemos compartido y también por los lamentos, porque desahogarse ayuda mucho, porque fui afortunada cuando pulsé el *Enter* en el ordenador del Ministerio de Sanidad y elegí Medicina

Interna en el Hospital 12 de Octubre, no podía haber coincidido con 4 personas mejores, sois especiales y el vínculo establecido durará para siempre. A mis residentes mayores y pequeños, con los que he trabajado y de los que he aprendido, de la medicina y de la vida. A Agustín por enseñarme tanto en la Urgencia y después en la planta, porque admiro tu capacidad para llegar hasta el diagnóstico más difícil, por tu amistad y por descubrirme las misas de 21h, de dónde cada domingo he sacado un consejo para intentar ser un poquito mejor persona.

A José María Aguado por aceptarme en la Unidad de Enfermedades Infecciosas y darme la oportunidad de aprender otros aspectos de la medicina, por tu estímulo para introducirme en el mundo de la investigación. A Francisco López Medrano por Dirigir con mayúsculas esta tesis, por el esfuerzo en leerla y corregirla priorizando sobre otras cosas para que me pudiera ir con todo terminado a Sudán del Sur, porque en estos 2 años me has enseñado mucho de tu forma de entender la medicina, de tu esfuerzo por buscar lo mejor para el paciente. Por los consejos que me has dado para la vida. Por ser un compañero. A Manolo (no añadido Lizasoain porque con Manolo me basta), porque aunque te diga chungo, sabes que es una palabra cariñosa en mi lenguaje y que eres una persona muy importante para mí. Porque me has enseñado y ayudado mucho en la Unidad, porque admiro y envidio cómo aciertas siempre en los casos cerrados, porque ya no se me olvidará nunca que *Bacteroides fragilis* significa catástrofe abdominal. Porque me has apoyado para que me esforzara en encontrar mi camino. A Carlos Lumbreras, por confiar en mí, por querer que participe en sus proyectos, por comprender lo importante de las decisiones vitales para avanzar en la vida. A Rafa San Juan, codirector de esta tesis, por apreciar mi trabajo en la Unidad.

A Mario, mi maestro Jedi, por adoptarme como tu Padawan desde que era la residente pequeña y tú el consultor *junior* en las guardias de planta. Por todo lo que me has enseñado, por tu estímulo continuo para la investigación. Por la paciencia cuando a horas intempestivas te escribía con mis dudas de la tesis, de BCG, de los pósters...Por tus consejos y por las charlas compartidas. A Jaime, por tu inestimable ayuda con el dichoso SPSS y su sintaxis, porque nos lo hemos pasado “pompa” con el Immuknow, aunque a veces yo me desanimara mucho. Porque, aunque sólo nos conocemos hace

un año, estas en la lista de los amigos importantes, por la complicidad y las risas. Por presentarme a tus primos, que ahora son mis primos de Madrid. A Julia por avisarme que había una vacante en la Unidad, por preocuparte siempre por mí, por hacer más divertido y llevadero el día a día, por tus consejos, en fin, por ser mi hermana mayor. A Nerea, compañera de fatigas en el máster, por las charlas compartidas, por animarme y apoyarme en mis proyectos vitales, porque espero que encuentres tu sitio en la medicina, el que te haga feliz. A Tamara por tu disponibilidad para todo, por tu cara sonriente, por la tranquilidad que me has transmitido en todo momento. A Alejandra y Elena, porque siento no haber tenido más tiempo para coincidir con vosotras.

A Cova, Pix, mi AMIGA con mayúsculas, por todo, por estar ahí siempre, por los miles de momentos compartidos, por aguantarme, por todos los favores que me has hecho, en relación a esta tesis y a miles de cosas más, por lo útil que me ha sido que supieras programar desde tu tierna infancia. Por lo bien que te has portado conmigo. Porque una amiga es una hermana que se elige. Porque en palabras no cabe todo lo que hemos vivido juntas y vamos a seguir viviendo. A Oti, por el cariño que te tengo, por la paz que me transmites y lo buena que eres, por tu comprensión, por las horas y horas de charlas sobre la vida y los sentimientos, porque también eres mi amiga especial. Porque las tres tenemos una conexión que va a durar siempre, no importa dónde nos lleve la vida.

A mis compañeras de piso por todas las horas que he pasado encerrada en la habitación con Immuknow en vez de con vosotras. Sobre todo a Nuria, juntas hemos vivido 8 años, los años que nos han hecho pasar a ser adultas, porque ahora vamos a continuar por caminos distintos, nuevos para las dos, pero que nos van a hacer avanzar en la vida hacia mejor. Porque una parte de ti se viene conmigo. A mis amigas de la Universidad, porque sois una joya, por lo que nos queremos, porque aunque estéis cada una en una punta de España hacéis siempre un esfuerzo para que nos juntemos y sigamos compartiendo. En especial a Larraitz, porque siempre me has dado empujoncitos para avanzar, por ese fin de semana en septiembre cuando estaba desanimada por esta tesis y por otras cosas importantes en la vida, por acogerme en

Andoain y animarme. Porque siempre ves lo positivo de la vida y eres para mí un ejemplo. Porque te quiero mucho.

A Yolanda, mi madre de Madrid, por todo lo que significas para mí, por tu cariño, por tus consejos, por tu ayuda y tus favores. Por escucharme y quererme tanto.

Por último, un agradecimiento especial al personal de la Biblioteca del Hospital Universitario 12 de Octubre, porque sin su inestimable ayuda hubiera sido imposible recopilar toda la información para esta Tesis. A los trasplantados renales, por prestarse a colaborar en este estudio. Al Servicio de Nefrología. A las enfermeras que se han encargado de extraer las muestras de los pacientes y a Ángeles por realizar el ensayo Immuknow® en el laboratorio de Inmunología. Gracias a todos porque sin ellos este trabajo no hubiera salido adelante.



## Índice

## Páginas

1. Introducción.....	15
1.1 Trasplante renal.....	16
1.2 Inmunología del trasplante .....	17
1.2.1 Sistema inmune: inmunidad innata y adquirida. Componentes del sistema inmune.....	17
1.2.2 Reconocimiento de antígenos por el sistema inmune adquirido. Complejo mayor de histocompatibilidad .....	21
1.2.3 Sistema inmune en la defensa frente a la infección .....	23
a) Defensa frente a bacterias extracelulares.....	24
b) Defensa frente a bacterias intracelulares .....	25
c) Defensa frente a virus.....	25
d) Defensa frente a parásitos .....	26
e) Defensa frente a hongos .....	26
1.2.4 Sistema inmune en el trasplante. Mecanismos de rechazo.....	27
1.3 Inmunosupresión en trasplante renal .....	30
1.3.1 Fármacos inmunosupresores .....	31
a) Glucocorticoides .....	33
b) Pequeñas moléculas.....	34
c) Anticuerpos.....	35
1.3.2 Esquemas de inmunosupresión en el trasplante renal .....	38
a) Tratamiento de inducción .....	38
b) Tratamiento de mantenimiento.....	38
c) Tratamiento de rechazo .....	39
1.3.3 Equilibrio en la inmunosupresión. Estado neto de inmuno- supresión en el paciente trasplantado .....	40

1.4 Infección en el paciente con trasplante de órgano sólido .....	40
1.4.1 Factores de riesgo de infección en el paciente trasplantado.....	41
1.4.2 Origen de las infecciones.....	42
1.4.3 Cronología de las infecciones tras el trasplante renal .....	43
a) Periodo precoz: primer mes tras el trasplante.....	43
b) Periodo intermedio: segundo a sexto mes post-trasplante.....	44
c) Periodo tardío: después del sexto mes .....	44
1.4.4 Prevención de las infecciones .....	45
1.5 Estrategias de monitorización de la inmunosupresión en pacientes	
trasplantados .....	46
1.5.1 Estrategias habituales de monitorización de la inmunosupresión	
en el trasplante renal.....	46
1.5.2 Estrategias dirigidas a conocer el estado neto de inmunosupresión	
del paciente trasplantado.....	47
a) Métodos de monitorización no específicos de un patógeno	
determinado .....	48
b) Métodos de monitorización específicos de un patógeno	
determinado .....	51
1.6 Monitorización de la inmunosupresión mediante la determinación	
de la concentración intracelular de ATP (iATP) en linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	
estimulados con fitohemaglutinina.....	56
1.6.1 Medición de la concentración intracelular de ATP	
mediante el test comercial Immuknow® .....	56
1.6.2 Patrón de concentraciones de iATP .....	57
1.6.3 Correlación entre las concentraciones de iATP y el recuento de	
linfocitos TCD4 <sup>+</sup> .....	57
1.6.4 Concentración intracelular de ATP en la predicción de las	
complicaciones post-trasplante .....	58
a) Concentración de iATP en la predicción del rechazo .....	58
b) Concentración de iATP en la predicción de infecciones .....	60
c) Concentración de iATP en la predicción de mortalidad .....	74

2. Justificación del estudio .....	75
3. Hipótesis del estudio .....	77
4. Objetivos.....	79
4.1 Objetivo primario .....	80
4.2 Objetivos secundarios .....	80
5. Pacientes, material y métodos .....	81
5.1 Lugar de realización del estudio .....	82
5.2 Diseño del estudio .....	82
5.3 Pacientes y periodo del estudio .....	82
5.4 Cronología del estudio. Visitas y seguimiento.....	83
5.5 Procedimientos del estudio: pruebas inmunológicas .....	85
5.6 Inmunosupresión y regímenes de profilaxis .....	87
5.6.1 Inmunosupresión.....	87
a) Tratamiento de inducción .....	87
b) Tratamiento de mantenimiento.....	88
5.6.2 Regímenes de profilaxis.....	89
5.7 Variables recogidas. Definiciones.....	89
5.7.1 Características del receptor.....	89
5.7.2 Características del donante .....	90
5.7.3 Variables pretrasplante .....	91
5.7.4 Variables intraoperatorias y perioperatorias .....	91
5.7.5 Variables post-trasplante .....	92
5.8 Consentimiento informado y comunicación del estudio .....	95
5.9 Análisis estadístico.....	96

6.Resultados .....	98
6.1 Descripción de la cohorte .....	99
6.1.1 Características de los receptores y los donantes .....	99
a) Características de los receptores .....	99
b) Características de los donantes.....	102
c) Serología de CMV en donantes y receptores .....	102
6.1.2 Variables peritrasplante y pautas de inmunosupresión y profilaxis .....	102
6.2 Descripción de la monitorización inmunológica .....	103
6.3 Descripción de los eventos postraplante .....	105
6.3.1 Infección .....	105
6.3.2 Rechazo.....	109
6.3.3 Otros eventos .....	110
a) Necesidad de diálisis postraplante.....	110
b) Estenosis de la arteria renal .....	111
c) Diabetes <i>mellitus de novo</i> postraplante .....	111
d) Neoplasia <i>de novo</i> post-trasplante .....	111
6.3.4 Mortalidad y supervivencia del injerto .....	111
6.4 Factores determinantes de los valores de iATP .....	113
6.5 Concentración de iATP y desarrollo de eventos en los 45 días siguientes a la monitorización con independencia del momento post-trasplante.....	118
6.5.1 Concentración de iATP y desarrollo posterior de cualquier evento.....	118
6.5.2 Concentración de iATP y desarrollo posterior de distintos tipos de eventos infecciosos.....	121
6.6 Distribución de los grados de respuesta inmune en función del evento desarrollado tras cada punto de monitorización .....	124
6.6.1 Distribución de los grados de respuesta inmune entre eventos (rechazo e infección) y no eventos.....	124

6.6.2 Distribución de los grados de respuesta inmune entre eventos infecciosos .....	125
6.7 Relación entre el grado de respuesta inmune en los momentos de monitorización establecidos y el desarrollo posterior de eventos infecciosos en los distintos periodos post-trasplante .....	126
6.7.1 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante precoz según el grado de respuesta inmune en el momento del trasplante.....	127
6.7.2 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante intermedio según el grado de respuesta inmune en el primer mes .....	129
6.7.3 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante tardío según el grado de respuesta inmune en el sexto mes .....	132
6.8 Supervivencia libre de infección en función del grado de respuesta inmune.....	134
6.8.1 Supervivencia libre de infección de cualquier tipo .....	134
6.8.2 Supervivencia libre de infección bacteriana.....	135
6.8.3 Supervivencia libre de enfermedad por CMV .....	136
6.9 Validez de la determinación de la concentración de iATP como prueba predictora de infección en pacientes trasplantados renales .....	137
6.9.1 Concentración de iATP en la predicción de infección en pacientes trasplantados: curvas ROC ( <i>Receiver Operating Characteristic</i> ).....	137
6.9.2 Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la concentración de iATP en la predicción de enfermedad por CMV .....	140
6.10 Parámetros que influyen en desarrollo de enfermedad por CMV .....	140
6.10.1 Predictores del desarrollo de enfermedad por CMV (análisis univariante) .....	140
6.10.2 Análisis multivariante de factores predictores del desarrollo de enfermedad por CMV .....	142

7. Discusión .....	143
7.1 Monitorización de los valores de iATP según un esquema pre- establecido.....	145
7.2 Evolución de la respuesta inmune determinada a través de la medición de iATP a lo largo del tiempo tras el trasplante .....	147
7.3 Variables que influyen sobre el valor de iATP tras el trasplante.....	148
7.4 Episodios infecciosos tras el trasplante.....	151
7.4.1 Infecciones bacterianas .....	151
7.4.2 Infecciones virales .....	152
7.5 Concentración de iATP y desarrollo posterior de complicaciones infecciosas tras el trasplante renal.....	153
7.6 Validez de la medición de iATP producido por los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en la predicción de enfermedad por CMV: sensibilidad y especificidad de la prueba .....	156
7.7 Concentración de iATP y desarrollo posterior de rechazo agudo tras el trasplante renal .....	157
7.8 Utilidad de la medición de la concentración de iATP en la práctica clínica .....	158
7.9 Limitaciones del estudio .....	161
7.10 Estudios futuros.....	163
8. Corolario .....	164
9. Conclusión .....	167
10. Bibliografía.....	169
11. Anexos .....	188
Anexo 1: Guía rápida de ensayo para la realización del test ImmuKnow® aportada por el fabricante (Cylex™/Viracor-IBT laboratories).....	189

Anexo 2: Consentimiento informado para el paciente .....	190
Anexo 3: Informe del Comité de Ética y Ensayos Clínicos .....	192
Anexo 4: Comunicaciones en relación con la tesis.....	193
12. Summary.....	196

## **1. INTRODUCCIÓN**



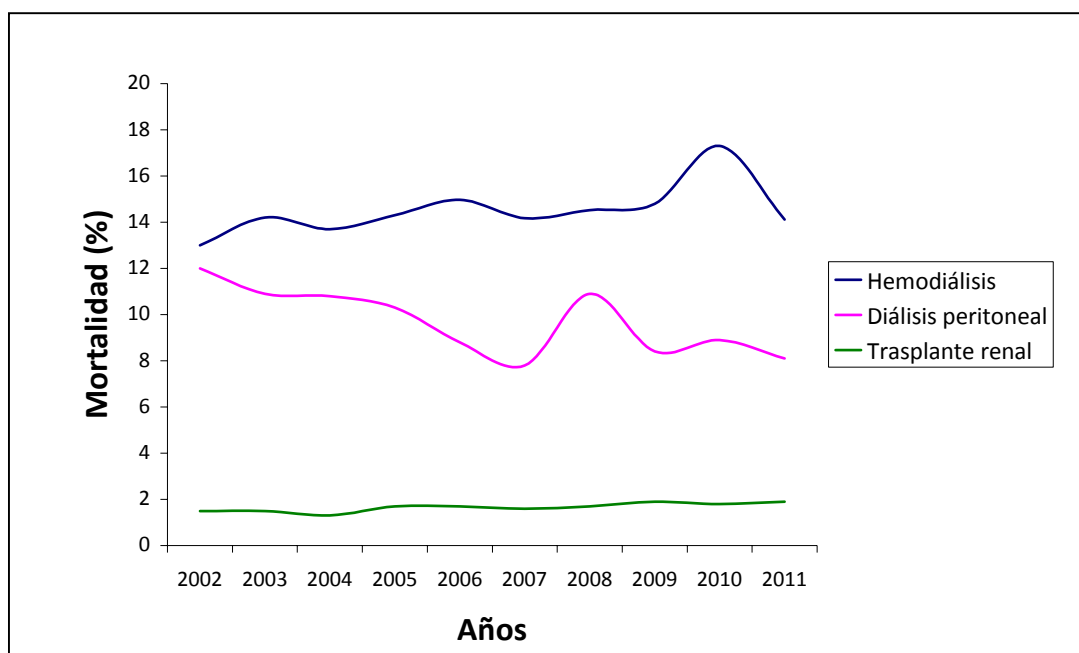
## 1. Introducción

### 1.1 Trasplante renal

El trasplante renal constituye actualmente la mejor opción terapéutica para la enfermedad renal terminal. Un trasplante renal realizado con éxito supone una mejora en la calidad de vida y una reducción en la mortalidad de la mayoría de pacientes con insuficiencia renal terminal, en comparación con la que presentan aquellos en diálisis (figura 1) [1].

En la actualidad se realizan en Estados Unidos unos 15.000 trasplantes renales al año y en España más de 2000, con una supervivencia del injerto renal próxima al 90% tras el primer año y en torno al 70% a los 5 años. La mortalidad de los pacientes trasplantados renales es inferior al 5% anual [2].

**Figura 1:** Mortalidad anual en pacientes en terapias de sustitución renal y pacientes trasplantados. Registro español de enfermos renales [1].



Desde la realización del primer trasplante renal en el hospital Peter Bent Brigham de Boston en 1954 [3], la supervivencia tanto del injerto como de los pacientes trasplantados ha ido mejorando progresivamente hasta alcanzar las cifras actuales. Este hecho ha sido debido fundamentalmente a los avances en la terapia inmunosupresora, con la consiguiente disminución en la incidencia de rechazo del órgano trasplantado; al avance en las técnicas quirúrgicas; y a la generalización del uso de profilaxis antimicrobiana, fundamentalmente frente a *Pneumocystis jirovecii* y citomegalovirus (CMV), que ha modificado los patrones de infección en el post-trasplante, con una drástica reducción en la incidencia y en la gravedad de las infecciones [4].

Pese a ello, la infección continúa siendo una de las principales causas de morbimortalidad en los receptores de trasplante de órgano sólido. De hecho, en la actualidad, las infecciones son una causa de hospitalización más frecuente que el rechazo en este grupo de pacientes. [5]. De ahí la importancia de desarrollar estrategias que permitan valorar el grado de inmunosupresión de cada paciente, para mantener un nivel adecuado y minimizar el riesgo de esta complicación tras el trasplante.

## **1.2 Inmunología del trasplante**

El sistema inmune está compuesto por una amplia gama de moléculas y células capaces de reconocer agentes extraños y desarrollar frente a ellos una respuesta defensiva que los destruya o anule funcionalmente. Conocer este sistema es imprescindible para comprender la aparición de infecciones, el rechazo de órganos trasplantados y el desarrollo del tratamiento inmunosupresor.

### **1.2.1 Sistema inmune: inmunidad innata y adquirida. Componentes del sistema inmune**

Los individuos sanos se protegen contra los microorganismos o agentes extraños gracias al sistema inmune. Los mecanismos de defensa de este

sistema se pueden clasificar en dos grupos: la inmunidad natural o innata y la inmunidad adquirida o específica, que actúan de forma interconectada [6-8].

La **inmunidad natural o innata** se basa en mecanismos de defensa presentes de forma constitutiva en el organismo. Actúan con carácter inmediato al ser inducidos muy rápidamente tras la aparición del estímulo agresor. No tienen capacidad de reconocimiento específico sino que identifican productos conservados del metabolismo de agentes microbianos, los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP). También pueden reconocer otras moléculas liberadas durante el daño tisular debido a infección o inflamación estéril a través de “patrones moleculares asociados al daño” (DAMP) que corresponden a las moléculas liberadas durante el daño tisular debido a infección o inflamación estéril [9].

Estos mecanismos de defensa no aumentan su eficacia en los subsiguientes contactos con un determinado agente, pero sí son capaces de activar la respuesta inmune adquirida. Esto lo logran a través de la presentación de agentes extraños (antígenos) a los linfocitos T por parte de las células fagocíticas y mediante la expresión de moléculas coestimuladoras o citoquinas (interleuquinas, quimioquinas) tras el reconocimiento de los PAMP por los receptores reconocedores de patrones (RRP), proteínas pertenecientes a la familia de los receptores *Toll-like* (TLR). Estos receptores están presentes en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e incluso células endoteliales.

Constituyen parte del sistema innato: a) células, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, los mastocitos y las células agresoras naturales o *natural killer* (NK); b) mediadores proteicos como el sistema del Complemento o la proteína C reactiva, entre otros; y c) el epitelio de piel y mucosas (figura 2). Este último supone un mecanismo de defensa no sólo al constituir una barrera física, sino también mediante de la producción de sustancias químicas microbicidas o inhibitoras del crecimiento de las bacterias (lisozimas o beta-defensinas), y gracias a la presencia en su superficie de bacterias no patógenas propias de la flora endógena.

La **inmunidad adquirida o específica** se basa en mecanismos más complejos que actúan de forma interconectada con la inmunidad innata potenciándose mutuamente de forma sinérgica. Por una parte, precisa de la participación de las células fagocíticas para reconocer antígenos y, por otra, la respuesta inmune específica amplifica los mecanismos protectores de la inmunidad natural.

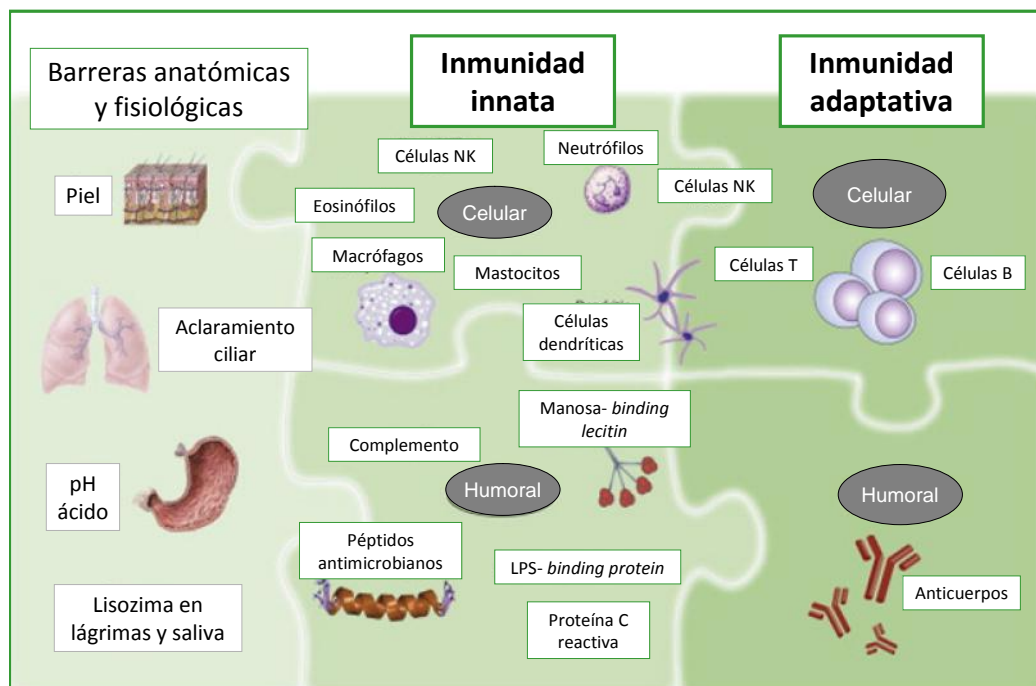
El sistema inmune adquirido es exquisitamente específico para las distintas macromoléculas y aumenta en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular (memoria inmunitaria). Sus mediadores son los linfocitos B y T (figura 2). Estas células disponen de un mecanismo de reordenación génica especial que les permite adquirir a lo largo de su desarrollo receptores específicos para distintos antígenos existentes en el medio, de forma que cada clon linfocitario expresa un receptor con una especificidad antigénica concreta, diferente de la que presenta otro clon. La unión de un determinado antígeno al receptor inicia una respuesta inmune específica cuyos efectos no aparecen de inmediato sino al cabo de unos días. Durante este periodo el clon se amplifica y experimenta cambios madurativos.

Las respuestas inmunitarias específicas se clasifican en dos grupos en función de los componentes que las median: la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

La **inmunidad humoral** está mediada por los anticuerpos, moléculas responsables del reconocimiento específico y eliminación de antígenos. Son secretados por los linfocitos B activados por las células T o bien estimulados directamente por algunos componentes inmunógenos de las paredes y cápsulas de los microorganismos. Cada anticuerpo es específico de un antígeno concreto y su unión desencadena una cascada de señales inflamatorias que finalmente promueve la fagocitosis y activación del Complemento, con la consiguiente lisis del microorganismo.

La **inmunidad celular** está mediada por los linfocitos T, de los que existen dos tipos: los  $CD8^+$  y los  $CD4^+$ . Los linfocitos  $CD8^+$ , o citotóxicos, reconocen células infectadas en cuya superficie se encuentra un antígeno extraño y las destruyen al liberar vesículas cargadas de perforinas y granzimas. Los linfocitos  $CD4^+$  pueden ser cooperadores, o *helper* (Th), o reguladores (Treg). Los linfocitos Th liberan factores (citoquinas) que estimulan a otras células (macrófagos, eosinófilos, linfocitos citotóxicos) para que lleven a cabo sus funciones; además esas citoquinas actúan sobre el propio linfocito Th, amplificando la respuesta inmune. A su vez, las células Treg producen factores que inhiben la proliferación de otros tipos celulares, por lo que son esenciales en el mantenimiento de la tolerancia inmune, es decir, en la regulación negativa de la respuesta inmune.

**Figura 2:** Componentes del sistema inmune. Modificado de Turvey SE et al [6].



Se distinguen varias categorías de linfocitos Th en función del perfil de interleuquinas (IL) que liberan [10]. Así, existen células de tipo Th1 que

promueven la producción de anticuerpos opsonizantes, la activación macrofágica y la inducción de citotoxicidad celular al secretar interferón (IFN)- $\gamma$  e IL-2, que además actúa sobre el propio linfocito Th1 favoreciendo su proliferación (mecanismo autocrino de IL-2). Hay células de tipo Th2 que inducen la producción de inmunoglobulina E e IgG4 y la estimulación de eosinófilos a través de la producción de IL-4 e IL-5. Otro subgrupo son las células de tipo Th17 que liberan IL-17 con un papel fundamental en las respuestas inflamatorias crónicas [11-13].

La diferenciación de las células Th hacia Th1 se produce en presencia de IL-12, producida por macrófagos y células dendríticas, e IFN- $\gamma$ , sintetizado por las células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La diferenciación hacia Th2 ocurre en presencia de IL-4, producida por mastocitos y eosinófilos; y hacia Th17 bajo la influencia de IL-6 y TGF $\beta$ .

#### 1.2.2 Reconocimiento de antígenos por el sistema inmune adquirido. Complejo mayor de histocompatibilidad

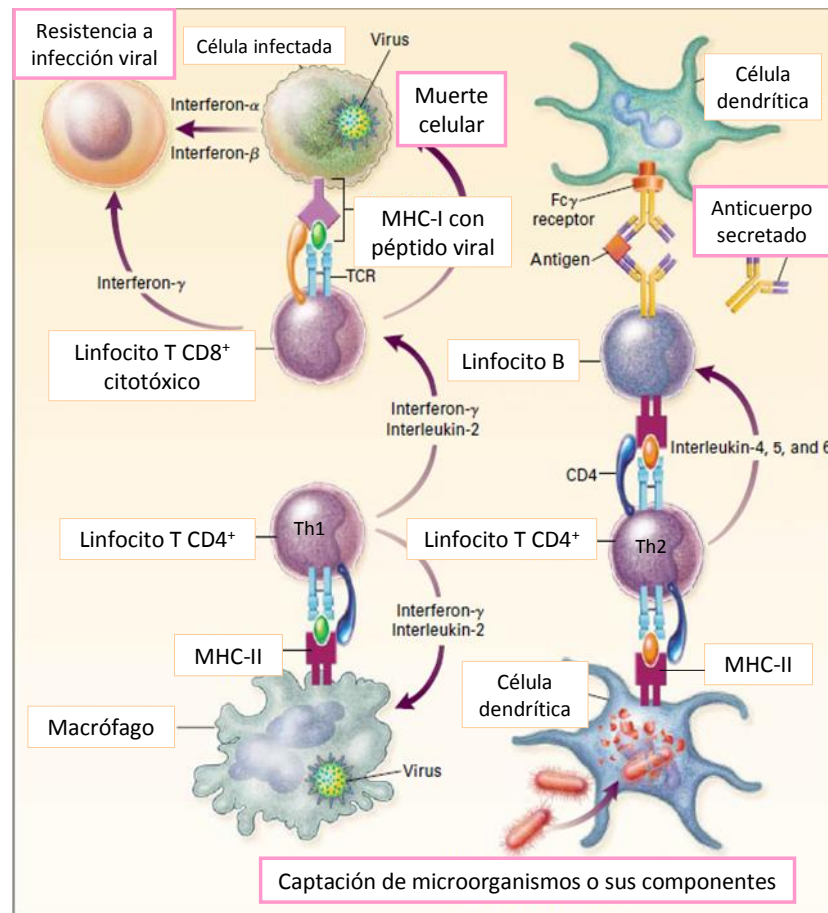
Los linfocitos T específicos para un antígeno no son capaces de reconocerlo en su forma libre, sino que es preciso que porciones del mismo conocidas como determinantes antigénicos, se unan a los productos de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para ser reconocidos [14]. Las proteínas codificadas por los genes del MHC se denominan moléculas o antígenos del MHC. El MHC humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y se denomina también con las siglas HLA (*human leucocitary antigens*).

Existen dos tipos distintos de productos genéticos del MHC: las moléculas de clase I y las moléculas de clase II. Hasta la fecha se han identificado seis *loci* que controlan la expresión de los antígenos del sistema HLA, tres de clase I (A, B y C) y tres de clase II (DP, DQ, DR). Cada individuo tiene dos alelos de cada uno de los 6 *loci*, uno procedente del padre y otro de la madre. Teniendo en cuenta que existen más de 40 alelos para algunos de los *loci* del HLA, los genes de este complejo son de los más polimórficos del genoma y de ahí la gran variabilidad entre individuos.

Las moléculas MHC de clase I (MHC-I) se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y presentan péptidos endógenos del citoplasma celular que habitualmente representan componentes normales de la célula, pero que en ocasiones pueden ser péptidos extraños como en el caso de células infectadas por virus o células tumorales. Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> presentan receptores (TCR-CD3/CD8) que reconocen antígenos procesados unidos al MHC de clase I. En el caso de que se trate de un antígeno anormal se activan señales que llevan a la muerte de la célula infectada o tumoral (figura 3). Por el contrario, si reconocen antígenos propios, la activación de señales es incompleta dando lugar a la anergia o apoptosis del linfocito T CD8<sup>+</sup> (tolerancia periférica).

Las moléculas MHC de clase II (MHC-II) presentan péptidos derivados de proteínas extracelulares. Se encuentran en la superficie de las “células presentadoras de antígenos” (APC), que incluyen las células dendríticas, los fagocitos mononucleares o macrófagos, los linfocitos B, las células de Langerhans de la piel y las células endoteliales. Una vez que las APC reconocen un antígeno extraño lo procesan en su interior hasta formar un péptido corto que se presenta en su superficie unido al MHC-II. Este complejo es reconocido por el receptor de los linfocitos TCD4<sup>+</sup> cooperadores (TCR-CD3/CD4) que liberarán una serie de citoquinas que activarán macrófagos y células citotóxicas, o bien estimularán a los linfocitos B para la producción de anticuerpos (figura 3).

**Figura 3:** Reconocimiento de antígenos por el sistema inmune adquirido. Modificado de Delves PJ et al [8].



Una vez reconocido el antígeno por la célula T es preciso que, además de la señal derivada del contacto entre el TCR y el complejo formado por el antígeno y el MHC, se produzca un contacto entre moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de la célula T y de la APC o la célula diana. Esta vía de señalización es fundamental para la correcta respuesta funcional de los linfocitos.

### 1.2.3 Sistema inmune en la defensa de la infección

La principal función fisiológica del sistema inmune es proteger al huésped frente a los microorganismos patógenos [15]. La evolución de una



enfermedad infecciosa en un individuo implica una secuencia de interacciones entre el microorganismo y el huésped: la entrada en el organismo, la invasión y colonización de tejidos y la lesión tisular. Esta última puede ser causada directamente por el propio patógeno, a través de toxinas producidas por el microorganismo, o incluso por la propia respuesta inflamatoria del huésped frente al microorganismo. Para que finalmente se produzca la enfermedad es preciso que el agente infeccioso logre eludir la respuesta inmune.

El primer obstáculo que debe superar el patógeno es el que constituyen la piel y mucosas que actúan no sólo como barrera física sino que además producen sustancias químicas microbicidas o inhibidoras del crecimiento bacteriano (lisozimas, betadefensinas). Cuando los microorganismos logran superar con éxito esta primera línea de defensa llegan a los tejidos donde se verán atacados por el resto de componentes del sistema inmune. Los distintos microorganismos estimulan diferentes respuestas inmunes (figura 4).

#### *a) Defensa frente a bacterias extracelulares*

El mecanismo principal de inmunidad frente a las bacterias extracelulares es la fagocitosis por neutrófilos, monocitos y macrófagos tisulares. La activación del sistema del Complemento por moléculas presentes en la pared de las bacterias (lipopolisacáridos, mananos) facilita esta función ya que las proteínas del Complemento recubren la superficie bacteriana (opsonización) y facilitan su reconocimiento por las células fagocíticas. Por otra parte, la activación del Complemento puede llevar a la formación del “complejo de ataque de membrana” que finalmente lisa las bacterias al crear poros en su pared. Además de la inmunidad innata, la inmunidad humoral es la principal respuesta inmune específica protectora frente a las bacterias extracelulares, puesto que los anticuerpos opsonizan bacterias, neutralizan toxinas y activan el sistema del Complemento.

*b) Defensa frente a bacterias intracelulares*

Las bacterias intracelulares son relativamente resistentes a la degradación en el interior de los fagocitos por lo que la inmunidad natural es poco eficaz para controlar la infección por estos microorganismos. La principal respuesta defensiva frente a estas bacterias es la inmunidad específica mediada por células. Ésta se basa en la presentación de antígenos bacterianos unidos al MHC-II a los linfocitos T  $CD4^+$ , pero también por el reconocimiento por los linfocitos  $CD8^+$  de antígenos bacterianos unidos al MHC-I en la superficie de la célula infectada. Como consecuencia de este reconocimiento se producen dos reacciones: la muerte de los microorganismos fagocitados por activación del macrófago por citoquinas derivadas de la célula Th1, y la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos. Mientras se produce esta respuesta inmune específica, las células NK estimuladas por IL-12 producida por los propios macrófagos infectados son capaces de producir la activación macrofágica mediante IFN $\gamma$  y promover la muerte de las bacterias fagocitadas.

*c) Defensa frente a virus*

Los virus son microorganismos intracelulares obligados que se replican dentro de la célula infectada utilizando la maquinaria de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del huésped, de modo que interfieren con la función celular normal y llevan a la muerte de ésta por efecto citolítico. En ocasiones los virus no son citopáticos por sí mismos, pero, al producir proteínas extrañas para el huésped, estimulan el sistema inmune que, finalmente, es el responsable del daño celular. La defensa frente a la infección viral está mediada por la inmunidad natural a través de la producción de IFN por la propia célula infectada que, por un lado, inhibe la replicación viral y, por otro, activa a las células NK para lisar las células infectadas. Además la activación del Complemento facilita la fagocitosis de las partículas virales del medio extracelular, al ser opsonizadas. Asimismo, la inmunidad específica juega un papel crucial, a través de una combinación de mecanismos humorales y celulares. El principal mecanismo de inmunidad específica

contra las infecciones virales establecidas es el linfocito T CD8<sup>+</sup> citotóxico, que se activa al reconocer antígenos virales en la superficie celular unidos al MHC-I, pero también a través de las citoquinas producidas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras reconocer antígenos virales presentados por las APC unidos al MHC-II. Estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> activan a los linfocitos B para diferenciarse a células plasmáticas y producir anticuerpos antivirales. Éstos pueden ser neutralizantes, ya que se unen a las proteínas de la cápside viral y evitan la unión de los virus a las células del huésped, o bien opsonizantes, recubriendo al virus y facilitando su fagocitosis.

#### *d) Defensa frente a hongos*

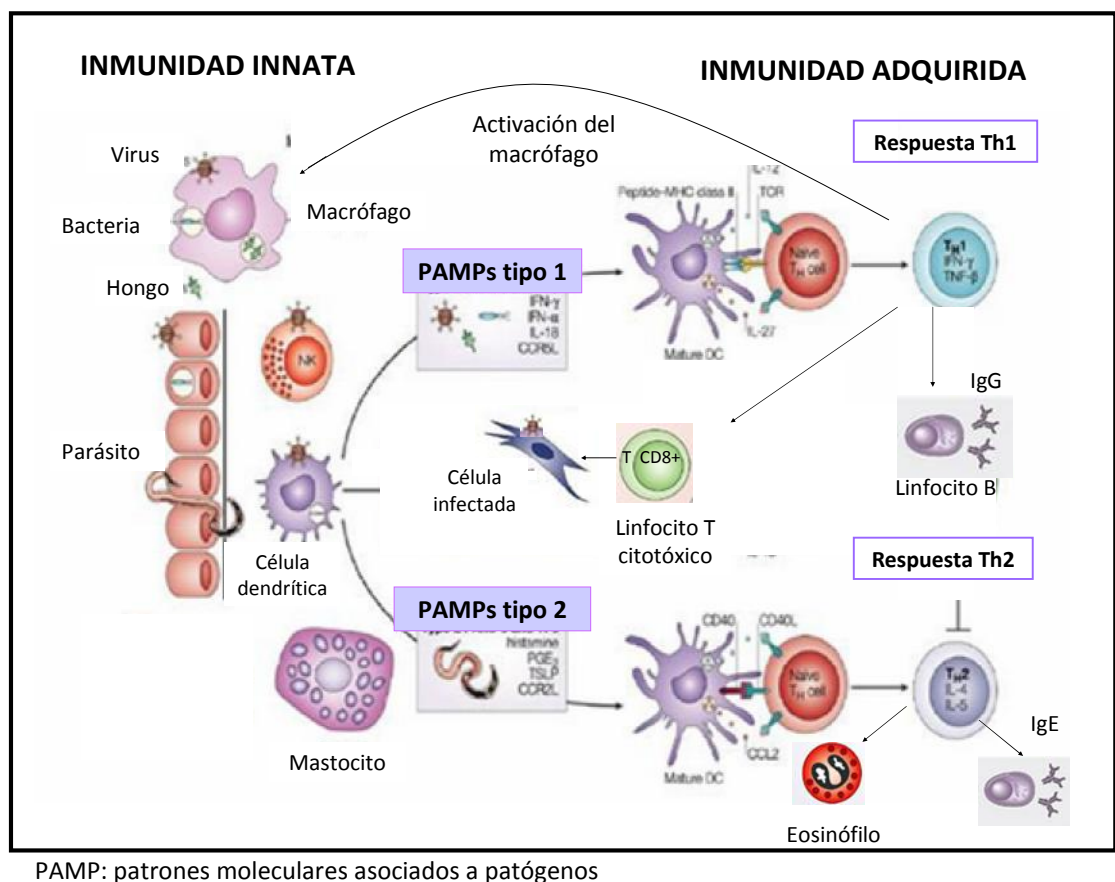
En la defensa frente a los hongos es crucial el papel de los neutrófilos y macrófagos. Las paredes de estos microorganismos presentan estructuras moleculares altamente conservadas (PAMP) que son reconocidas por los “receptores reconocedores de patrones” (RRP) en macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, lo que favorece su fagocitosis además de la síntesis de mediadores solubles (IL-1, IL-6, IL-12, IFN $\gamma$ ). Este proceso está facilitado por la opsonización por el sistema del Complemento [16]. La presentación de antígenos del hongo por las APC a los linfocitos T en un contexto en el que predominan la IL-12 y el IFN $\gamma$  o la IL-6 determinan su diferenciación hacia Th1 o Th17 respectivamente. La IL-17 sintetizada por los linfocitos Th-17 confiere protección frente a infecciones por *Candida*, *P.jirovecii* o *Cryptococcus*, a través del reclutamiento de neutrófilos en el foco de la infección y la inducción de la expresión de determinadas quimioquinas [11-13, 17-19].

#### *e) Defensa frente a parásitos*

Los helmintos y los protozoos difieren en su estructura y propiedades químicas, por lo que parásitos diferentes desencadenan respuestas inmunes distintas. Así, los helmintos suelen desencadenar respuestas Th2 que dan lugar a la producción de anticuerpos IgE específicos y a eosinofilia. La citotoxicidad dependiente de IgE mediada por los eosinófilos, que

reconocen a través de sus receptores la IgE sobre la membrana del helminto y liberan el contenido de sus gránulos, puede ser más eficaz en la destrucción de estos patógenos que las enzimas proteolíticas y los derivados reactivos de oxígeno de los neutrófilos y macrófagos. Otros parásitos, como los protozoos intracelulares, pueden estimular respuestas Th1 con la consiguiente activación de macrófagos y la formación de granulomas que contienen la infección, o bien estimular linfocitos T citotóxicos que destruyen la célula infectada.

**Figura 4:** Mecanismos de defensa frente a la infección.



#### 1.2.4 Sistema inmune en el trasplante. Mecanismos de rechazo agudo

En condiciones normales, el trasplante de cualquier órgano o tejido realizado entre individuos genéticamente distintos provoca una respuesta inmune de

rechazo del mismo. Lo que el sistema inmune del receptor reconoce como extraño en el implante son los antígenos de histocompatibilidad del donante (MHC o HLA). El gran polimorfismo de los genes del HLA supone que una identidad total en este sentido sea prácticamente imposible entre donante y receptor, lo que determinará la activación de una respuesta inmune frente a los antígenos HLA del injerto (aloantígenos). Esta respuesta inmune puede estar mediada por células o tratarse de una respuesta humoral.

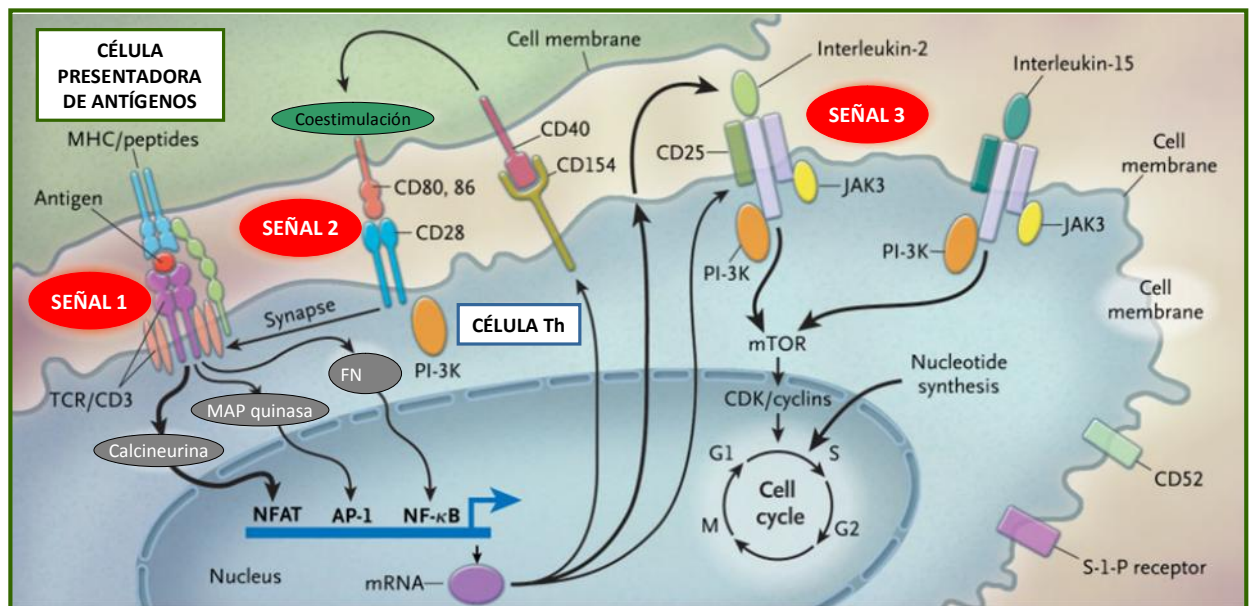
El reconocimiento del aloantígeno por parte del linfocito T es el evento crucial que activa la cascada de sucesos que finalmente llevarán al rechazo del órgano trasplantado. El aloantígeno puede ser reconocido por dos vías:

- Directa: las células T del receptor reconocen aloantígenos (alo-HLA) en la superficie de las células del donante. Tales alo-HLA pueden ser de clase I (reconocidos por linfocitos T citotóxicos) o de clase II (reconocidos por linfocitos Th). Éstos últimos se encuentran presentes en las células dendríticas intersticiales propias del donante y en las células endoteliales, ambas presentes en el órgano trasplantado [20,21].
- Indirecta: las células T del receptor reconocen aloantígenos presentados por las propias células presentadoras de antígenos del receptor. En este caso, los alo-HLA liberados por las células del donante son fagocitados por las APC del receptor y presentados a las células Th [22].

El reconocimiento del aloantígeno por la célula Th requiere dos señales: el reconocimiento a través del receptor de la célula Th (TCR-CD3/CD4) y una señal coestimuladora, fruto de la interacción entre las moléculas CD80 y CD86 (B7) presentes en la APC y su receptor CD28 en la célula Th. Una vez reconocido el aloantígeno se activan tres vías de transducción: la vía calcio-calcineurina, la vía de la proteína quinasa activada por el mitógeno RAS (MAP-quinasa) y la vía del factor nuclear  $\kappa\beta$  [23]. Estas vías activan factores de transcripción que desencadenan la expresión de varias moléculas, entre ellas

la IL-2, el CD154 y el CD25 (también llamado receptor de IL-2). A su vez, la IL-2, que actúa de forma autocrina sobre la propia célula Th, activará otra señal que finalmente llevará a la proliferación del linfocito. Esta última señal en la activación linfocitaria está mediada por la “vía del receptor de rapamicina”, o *mamalian target of rapamicina*- mTOR (figura 5) [24].

**Figura 5:** Activación de la célula T según el modelo de tres señales. Modificado de Halloran et al [24].



Una vez activado, el linfocito Th libera una serie de mediadores que inducen la activación de los linfocitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ), macrófagos y células NK y linfocitos B. Los linfocitos T citotóxicos reconocerán alo-HLA de clase I en la superficie de las células del injerto y liberarán sustancias líticas con el consiguiente daño celular (rechazo celular), en el que también participarán los macrófagos y las células NK. Por su parte, los linfocitos B sintetizarán anticuerpos dirigidos contra las células endoteliales del donante (aloanticuerpos) y activarán la cascada del complemento, con el consiguiente daño vascular (rechazo humoral).

Puede ocurrir además, que los receptores de un trasplante renal hayan desarrollado anticuerpos dirigidos contra antígenos del sistema HLA de clase I por transfusiones, embarazos o trasplantes previos. Esta presencia de aloanticuerpos preformados frente a antígenos del sistema HLA presentes en el órgano trasplantado incrementa notablemente el riesgo de un rechazo humoral hiperagudo.

En el periodo inmediato tras el trasplante la respuesta inmune generada es tanto celular como humoral. Así, en ausencia de una correcta inmunosupresión, los linfocitos Th activados infiltran el parénquima del injerto y desencadenan una potente respuesta inflamatoria en la que participan también macrófagos, células NK, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B que se diferencian a células plasmáticas que sintetizan aloanticuerpos. Esta infiltración supone un deterioro de la función del injerto.

Con el paso del tiempo disminuye la respuesta específica del receptor frente al injerto y con ello el riesgo de rechazo agudo. Se produce, por lo tanto, una adaptación del receptor al órgano trasplantado, un proceso que se conoce como “tolerancia adaptativa”. A este proceso contribuyen factores como la pérdida de las células dendríticas del injerto, la disminución de la respuesta aloinmune gracias a la activación de células T reguladoras, la menor reactividad a los antígenos del donante por parte de las células T del receptor, y los fármacos inmunosupresores. Predomina entonces el riesgo de rechazo crónico en el que no sólo intervienen factores inmunes sino también la isquemia, la toxicidad farmacológica y determinadas infecciones.

### **1.3 Inmunosupresión en el trasplante renal**

Para evitar el rechazo del injerto es esencial una adecuada compatibilidad entre el sistema HLA del donante y del receptor. En este sentido, no todas las series alélicas HLA tienen la misma importancia a la hora de desencadenar un rechazo por lo que, en la

práctica, la búsqueda de una buena compatibilidad se limita a los *locus* DR, B y A en este orden de importancia. Sin embargo, el enorme polimorfismo del sistema HLA hace prácticamente imposible encontrar un donante completamente compatible con el receptor. Para solventar este problema se han desarrollado fármacos inmunosupresores eficaces que evitan la activación del sistema inmune y han permitido prescindir de la compatibilidad HLA como el principal elemento decisivo en la selección de la pareja donante-receptor. No obstante, antes del trasplante es necesario garantizar, mediante una prueba cruzada de microlinfotoxicidad (*cross-match*), que el receptor no tiene anticuerpos preformados dirigidos específicamente contra antígenos HLA del donante. De esta manera, se trata de evitar el rechazo hiperagudo.

### 1.3.1 Fármacos inmunosupresores

La inmunosupresión puede conseguirse mediante la depleción de linfocitos o a través del bloqueo de la respuesta linfocitaria, por lo que se han desarrollado fármacos que actúan en este sentido y evitan el rechazo. Sin embargo, estos fármacos presentan efectos secundarios derivados de su toxicidad intrínseca sobre los tejidos (nefrotoxicidad, toxicidad gastrointestinal y pulmonar) y de la propia inmunosupresión que producen. Esta inmunosupresión conlleva un aumento del riesgo de infección y cáncer [4, 25,26].

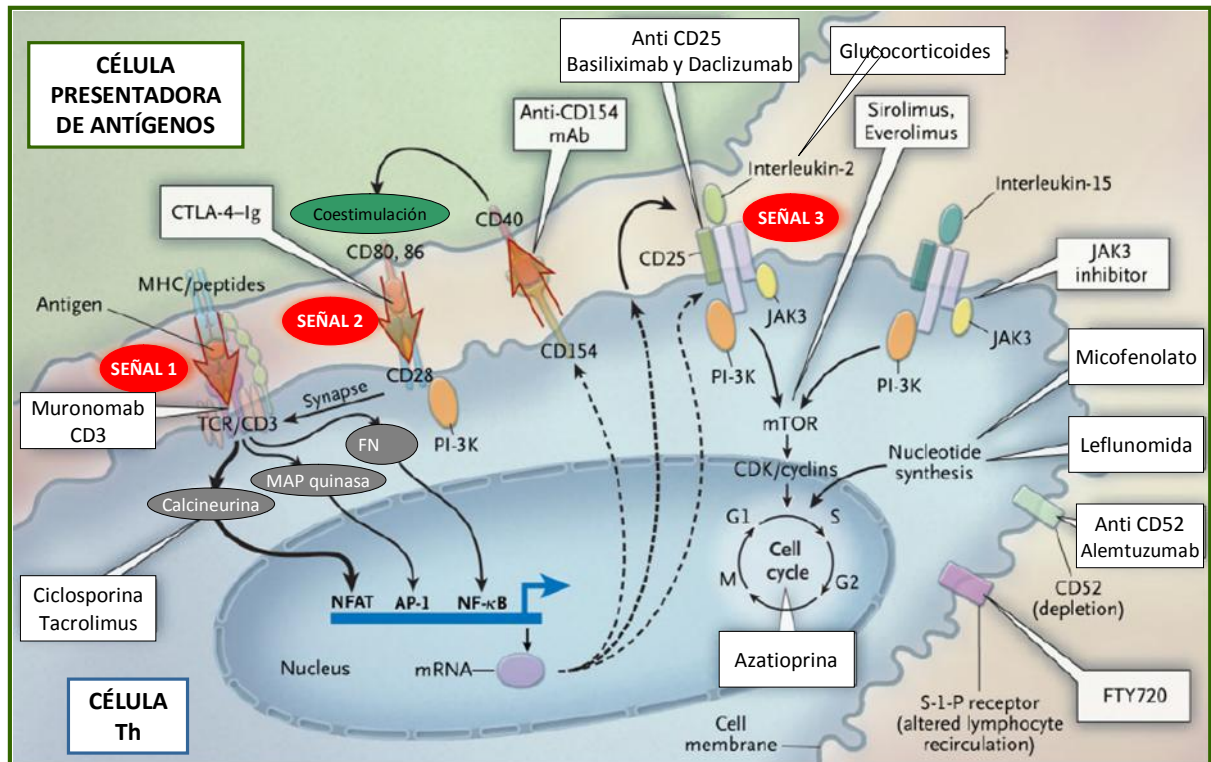
Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar en tres grupos en función de su estructura: esteroides, “pequeñas moléculas” y anticuerpos. En la tabla 1 se resumen sus principales mecanismos de acción y efectos secundarios y en la figura 6 las dianas sobre las que actúan [24, 27].



**Tabla 1.** Mecanismo de acción y toxicidad de los fármacos inmunosupresores empleados en el trasplante de órgano sólido.

Grupo	Mecanismo de acción		Fármaco	Efectos secundarios
GLUCOCORTICOIDES	Antagonistas del receptor de glucocorticoides: bloqueo en la producción de IL-2		GLUCOCORTICOIDES	Diabetes (DM), hipertensión (HTA), osteoporosis, alteración neuropsiquiátrica
	Inhibidores de la síntesis de purinas		AZATIOPRINA (Aza)	Leucopenia, mielotoxicidad hepatotoxicidad
PEQUEÑAS MOLÉCULAS		Inhibidores de Calcineurina	MICOFENOLATO MOFETIL (MFM)	Diarrea, neutropenia, anemia
	CICLOSPORINA (CsA)		Nefrotoxicidad, HTA, DM, neurotoxicidad, hirsutismo, hiperplasia gingival, dislipemia (DL)	
	Inhibición de la señal de IL-2 a través de la inhibición de mTOR	TACROLIMUS (FK506)	Similares a los de ciclosporina pero menor incidencia de HTA, DL e hirsutismo y mayor de DM y neurotoxicidad	
		SIROLIMUS (Rapamicina)	DL, trombopenia, retraso de cicatrización, neumonitis	
		EVEROLIMUS	Similar a Sirolimus	
ANTICUERPOS MONOCLONALES	No depleción linfocitos	Anti-CD25 (receptor de IL-2)	BASILIXIMAB	Reacciones de hipersensibilidad
			DACLIZUMAB	Similar a Basiliximab
	Depleción de linfocitos	Anti-CD3 (depleción linfocitos T)	MURONOMAB CD3 (OKT3)	Síndrome de liberación de citoquinas*, fracaso renal agudo
		Anti-CD52 (depleción linfocitos T)	ALEMTUZUMAB	Síndrome leve de liberación de citoquinas*, mielotoxicidad
		Anti- CD20 (depleción linfocitos B)	RITUXIMAB	Reacciones de hipersensibilidad y reacciones de infusión
ANTICUERPOS POLICLONALES	Depleción de linfocitos	Depleción prolongada de linfocitos T mediante bloqueo de CD2, CD3, CD45 y destrucción de linfocitos T periféricos.	Inmunoglobulina policlonal de conejo antitimocito TIMOGLOBULINA	Síndrome de liberación de citoquinas*, enfermedad del suero, leucopenia, trombopenia
			Inmunoglobulina linfocitaria policlonal de caballo antitimocito ATGAM	Similar a la timoglobulina
		No depleción linfocitos	Bloqueo de aloanticuerpos	Inmunoglobulina intravenosa inespecífica

\* Síndrome derivado de la liberación masiva de citoquinas (IL-2, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) tras la administración de anticuerpos que producen depleción de linfocitos. Las citoquinas estimulan la producción de leucotrienos, prostaglandinas y endoperoxidasas que producen fiebre, hipotensión, edema pulmonar no cardiogénico, broncoespasmo, espasmo coronario.

**Figura 6:** *Dianas sobre las que actúan los distintos fármacos inmunosupresores.**Modificado de Halloran et al [24].***a) Glucocorticoides**

Estas sustancias actúan a través de distintas vías que conducen a la inmunosupresión. Así, por un lado, bloquean la activación linfocitaria dependiente de antígeno e inhiben la producción de IL-2 con lo que alteran la proliferación de los linfocitos T, inhiben la función de los macrófagos, inducen la apoptosis de linfocitos e impiden la síntesis de anticuerpos; y, por otro, poseen acción antiinflamatoria al disminuir la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Esta potente actividad inmunosupresora y antiinflamatoria hace que los esteroides sean especialmente útiles en el tratamiento de los episodios de rechazo agudo cuando se emplean a altas dosis, al igual que en el tratamiento inmunosupresor primario tanto en la fase de inducción como de mantenimiento en dosis menores.

*b) Pequeñas moléculas*

Se incluye en este grupo una serie de moléculas derivadas de productos microbianos cuyas dianas son proteínas altamente conservadas en la evolución de las especies. Se pueden clasificar en tres subgrupos:

- Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (antimetabolitos)

Forman parte de este grupo la azatioprina (Aza) y el micofenolato mofetil (MMF). La Aza es un derivado de la 6-mercaptopurina que inhibe la síntesis de purinas y por tanto bloquea la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) y con ello la proliferación de linfocitos T y B. Su acción es inespecífica, por lo que inhibe la proliferación de todas las células de crecimiento rápido. Se ha utilizado clásicamente en tratamientos inmunosupresores de inducción y mantenimiento junto con ciclosporina y esteroides, pero, por su efecto poco selectivo, cada vez se emplea menos como fármaco de primera elección. El MMF es un profármaco del ácido micofenólico, un inhibidor reversible selectivo de la enzima monofosfato deshidrogenasa cuyo papel es fundamental en la síntesis *de novo* de purinas. Ya que los linfocitos T y B dependen específicamente de esta síntesis *de novo*, el MMF inhibe de forma selectiva la proliferación linfocitaria. Se utiliza en la terapia de inducción y mantenimiento en combinación con otros fármacos. Ha demostrado ser eficaz en la prevención de rechazo agudo e incluso crónico [28].

- Inhibidores de la producción de citoquinas

En este grupo se encuentran la ciclosporina (CsA) y el tacrolimus (FK506), moléculas que actúan a través de la inhibición de la calcineurina. Se unen a inmunofilinas plasmáticas formando complejos activos que se unen a la calcineurina e inhiben su actividad y, como consecuencia, la síntesis de IL-2 y otras citoquinas. La CsA fue el primer fármaco anticalcineurínico introducido en la práctica clínica y fue decisivo para el avance del trasplante de órgano sólido. El FK506, descubierto posteriormente, tiene una potencia de 10 a 100 veces mayor que la CsA

y en la actualidad es el más empleado ya que ha demostrado menor incidencia de rechazo agudo, de rechazo agudo resistente a esteroides y de rechazo crónico [29,30].

Ambos fármacos se emplean en la inmunosupresión primaria, tanto en la inducción como en el mantenimiento. Por la menor incidencia de rechazo, el FK506 es el elegido en primer lugar y se reserva el uso de CsA para aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar diabetes, como ancianos u obesos, dado el perfil de toxicidad del FK506 (tabla 1). Este último es además eficaz en el tratamiento del rechazo agudo corticorresistente y en el refractario a otros tratamientos [31].

- Inhibidores de la acción de las citoquinas

Pertenecen a este grupo el sirolimus (rapamicina) y el everolimus. Ambos actúan mediante su unión a la mTOR, lo que inhibe la transmisión de la señal de transducción que se origina tras la unión de la IL-2 a su receptor. Este mecanismo impide finalmente la proliferación de los linfocitos. El uso de estos fármacos disminuye la incidencia de rechazo agudo y permite una reducción de dosis o incluso evitar el empleo de inhibidores de calcineurina [32], con lo cual son de utilidad en situaciones de nefrotoxicidad secundaria a FK506 o CsA. No obstante, por su actividad antiproliferativa sobre fibroblastos, alteran la cicatrización de las heridas por lo que es preferible no utilizarlos en los primeros días tras el trasplante.

c) *Anticuerpos*

Constituyen este grupo un conjunto de gammaglobulinas o anticuerpos inmuno-moduladores. Pueden ser monoclonales, dirigidos frente a una proteína concreta de la membrana del linfocito; o policlonales, obtenidos de la inmunización de animales con linfocitos T humanos de forma que se producen diversos anticuerpos dirigidos contra varios receptores de la membrana de linfocitos. Ambos tipos de anticuerpos pueden producir o no una depleción total de linfocitos (Tabla 1). La recuperación del efecto

producido por aquellos que causan depleción linfocitaria puede tardar meses o, incluso, años.

- Anticuerpo monoclonal anti CD3

El muronomab CD3 (OKT3) es un anticuerpo monoclonal de origen murino dirigido contra el complejo CD-3/TCR expresado en la membrana de los linfocitos T (tanto maduros como inmaduros o timocitos), con lo que bloquea la generación y funcionalidad de las células T maduras que finalmente son lisadas. Induce una depleción total de linfocitos T que es reversible tras su retirada, al generarse nuevas células. Puede emplearse en la fase de inducción como profilaxis del rechazo y como tratamiento de rescate en episodios de rechazo resistente a glucocorticoides o al tratamiento con gammaglobulina policlonal. El muronomab CD3 se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad linfoproliferativa post-trasplante [33] y a un incremento de infecciones por virus del grupo herpes [34, 35], fúngicas y bacterianas, por lo que se aconseja el empleo de pautas profilácticas durante su administración.

- Anticuerpos monoclonales anti CD25

El basiliximab y el daclizumab son anticuerpos monoclonales de origen murino dirigidos contra la subunidad CD25 del receptor de IL-2 que se expresa únicamente en linfocitos T activados (no en linfocitos T en reposo), por lo que no producen depleción total de linfocitos. Estos anticuerpos impiden la unión de la IL-2 con su receptor de forma que suprimen la proliferación de linfocitos T mediada por esta interleuquina. Se utilizan en inducción asociados a otros fármacos inmunosupresores y han demostrado disminuir la incidencia de rechazo agudo [36].

- Anticuerpo monoclonal anti CD52

El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado específico anti-CD52 que produce una depleción de aquellos linfocitos que expresan CD52, principalmente linfocitos T, con una recuperación lenta

de los recuentos celulares tras su uso que puede demorarse hasta un año. No obstante, el empleo de este anticuerpo posee la ventaja de permitir regímenes inmunosupresores de mantenimiento menos intensos sin que aumente el riesgo de rechazo [37].

- Anticuerpo monoclonal anti CD20

El rituximab se dirige contra la molécula CD20 que se expresa en los linfocitos B con lo que produce la destrucción de estas células y, en consecuencia, la disminución de la síntesis de inmunoglobulinas (Ig), ya que los linfocitos B son los precursores de las células plasmáticas productoras de Ig. Al provocar una inmunosupresión humoral el rituximab se emplea en el tratamiento del rechazo mediado por anticuerpos. Su uso se ha asociado a la infección por el virus JC y a la reactivación del virus de la hepatitis B (VHB), por lo que se debe considerar la necesidad de profilaxis en pacientes con infección previa por VHB [38].

- Anticuerpos policlonales antitimocito

Las gammaglobulinas antitimocíticas (ATG) se obtienen mediante la inmunización de conejos (Timoglobulina®) o caballos (Atgam®) con linfocitos T o timocitos humanos de manera que se obtiene un suero con múltiples anticuerpos que bloquean proteínas de la membrana de los linfocitos T como CD2, CD3, CD45. Ello conduce a una linfopenia profunda que dura al menos un año tras su administración. Se utilizan en la inducción por su eficacia en reducir la frecuencia y gravedad del rechazo agudo, así como en el tratamiento de rechazo corticorresistente.

- Inmunoglobulina inespecífica

Se obtiene de plasma de varios donantes sanos. Bloquea los alo-anticuerpos por lo que es de utilidad en el tratamiento del rechazo agudo humoral.

### 1.3.2 Esquemas de inmunosupresión en el trasplante renal

La terapia inmunosupresora es un proceso dinámico que debe adaptarse a los distintos periodos del post-trasplante, en los que el riesgo de rechazo difiere, y a las características individuales de cada receptor de trasplante [39]. Se diferencian tres momentos en el tratamiento inmunosupresor post-trasplante: la inducción, el mantenimiento y el tratamiento del rechazo.

#### *a) Tratamiento de inducción*

El tratamiento de inducción es el administrado durante el periodo inmediato tras el trasplante. Busca una inmunosupresión intensa puesto que el riesgo de rechazo agudo en este periodo es mayor. En general, las estrategias de inducción empleadas en el trasplante renal pueden ser de dos tipos: las basadas en el uso de altas dosis de inmunosupresores convencionales, es decir, esteroides asociados a un inhibidor de calcineurina (habitualmente tacrolimus) y un antimetabolito (azatioprina o micofenolato); o bien, en la utilización de dosis más bajas de estos agentes convencionales combinados con anticuerpos dirigidos contra células T, normalmente timoglobulina o basiliximab [39]. Esta última pauta es más eficaz en prevenir el rechazo y el fracaso del injerto, por lo que será la elegida en primer lugar salvo en casos con bajo riesgo inmunológico. La timoglobulina es superior al basiliximab en la prevención del rechazo agudo [40], por lo que se reserva este último para pacientes con leucopenia o trombopenia previa al trasplante o en caso de que sean portadores de otro injerto (hepático, pulmonar, cardíaco).

#### *b) Tratamiento de mantenimiento*

Con el transcurso del tiempo disminuye el riesgo de rechazo agudo puesto que la respuesta específica del receptor frente al injerto es menos intensa. Predomina a partir de entonces el riesgo de rechazo crónico, que no sólo está mediado por el sistema inmune sino que se debe también a la isquemia del órgano trasplantado, a la nefrotoxicidad de los fármacos

inmunosupresores y a las infecciones crónicas. En esta etapa la inmunosupresión se basa en dosis menores de inhibidores de calcineurina y antimetabolitos con disminución progresiva de las dosis de esteroides, que en ocasiones pueden suspenderse. En algunos casos, como tratamiento de mantenimiento se pueden utilizar los inhibidores de mTOR como sustitutos de los inhibidores de la calcineurina (reducen la nefro-toxicidad de éstos) o del MFM (disminuyen el riesgo de rechazo agudo tardío y de infección por CMV, en comparación con el MFM).

*c) Tratamiento del rechazo*

El rechazo agudo mediado por anticuerpos se trata con plasmaferesis, inmunoglobulina inespecífica, rituximab y aumento de dosis de tacrólimus y MFM [41]. El rechazo agudo celular puede responder a altas dosis de glucocorticoides, pero en el caso de que sea corticorresistente será necesario el uso de anticuerpos antilinfocito como el muronomab (OKT3) o la timoglobulina [42].

El rechazo crónico supone la principal causa de fracaso tardío del injerto con pobre respuesta al tratamiento, por lo que es fundamental su prevención. Así, por un lado, se deben evitar los episodios de rechazo agudo, el daño isquémico y la nefrotoxicidad por fármacos; y, por otro, se debe ajustar la inmunosupresión buscando la menor nefrotoxicidad posible, sin un aumento notable del riesgo de rechazo agudo. Para ello se puede intentar disminuir la dosis de inhibidores de calcineurina o sustituirlos por mTOR, sustituir la azatioprina por MFM y, en el caso de que exista un componente de rechazo humoral - depósitos de complemento (C4d) en la biopsia renal o presencia de aloanticuerpos donante específicos- se debe considerar el uso de inmunoglobulina inespecífica, rituximab o plasmaféresis. Además, son fundamentales las intervenciones no inmunológicas como el control estricto de la presión arterial y de la dislipemia, utilizando fármacos inhibidores del sistema renina-angiotenina (IECA) y estatinas [43].



### 1.3.3 Equilibrio en la inmunosupresión. Estado neto de inmunosupresión

El mantenimiento de un nivel adecuado de inmunosupresión es de gran importancia para minimizar las complicaciones tras el trasplante. Por un lado, la infrainmunosupresión puede dar lugar a un rechazo, con el subsecuente deterioro de la función del injerto o, incluso, pérdida del mismo. Por otro, un exceso de inmunosupresión puede promover la aparición de infección y de neoplasias malignas (síndrome linfoproliferativo post-trasplante, cáncer de piel o cáncer anogenital, fundamentalmente). Por lo tanto, lograr un equilibrio preciso en el grado de inmunosupresión supone uno de los mayores retos de la medicina del trasplante.

El estado neto de inmunosupresión del paciente es una función compleja determinada por la interacción de varios factores que contribuyen a la susceptibilidad (o resistencia) individual a la infección. Entre estos factores se encuentran el tipo, dosis, duración y secuencia temporal del tratamiento inmunosupresor; la respuesta individual del paciente a los fármacos; la edad, género y pasado genético del paciente; la presencia de enfermedades subyacentes y comorbilidades; los factores del receptor que afectan a la función inmune (neutropenia, hipogammaglobulinemia, disminución del número de linfocitos T CD4, problemas metabólicos como diabetes, uremia o malnutrición); y, por último, la existencia de infecciones concomitantes por virus inmunomoduladores [CMV, virus de Epstein-Barr (VEB), virus herpes humano 6 y 7, virus de las hepatitis B y C, y VIH] [44-49].

## **1.4 Infección en el paciente trasplantado**

El desarrollo de nuevos fármacos inmunosupresores ha derivado en una menor incidencia de infección, quizás al prevenir el rechazo y, por lo tanto, evitar la necesidad de fármacos inmunosupresores más potentes para revertirlo [24]. Pese a ello, las infecciones continúan siendo una causa importante de complicación y mortalidad en

trasplantados. De hecho, hasta el 75% de estos pacientes presentarán al menos un episodio de infección durante el primer año post-trasplante [50].

Se debe tener en cuenta que el diagnóstico de la infección en este grupo de pacientes puede ser complicado debido a: a) una menor respuesta inflamatoria que resulta en una disminución de la sintomatología y, en ocasiones, ausencia de hallazgos radiológicos; b) la alteración en la anatomía debida a la cirugía del trasplante que modifica los signos exploratorios; c) la pobre utilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección aguda al retrasarse la seroconversión en el paciente inmunosuprimido; y d) la existencia de causas de fiebre no infecciosa (rechazo, reacción farmacológica) que pueden mimetizar una infección [4, 51].

Por todas estas razones, el diagnóstico puede ser tardío, cuando la infección ya está diseminada y la morbimortalidad del paciente es muy elevada. Es preciso, por lo tanto, conocer los factores que determinan el riesgo de desarrollar infecciones en el paciente trasplantado, el origen de las mismas y su cronología para poder realizar un diagnóstico precoz y específico, e instaurar a tiempo un tratamiento adecuado. Asimismo, es esencial establecer pautas de profilaxis en función del riesgo individual de cada receptor de trasplante de órgano sólido.

#### 1.4.1 Factores de riesgo de infección en el paciente con trasplante de órgano sólido

El paciente trasplantado presenta el mismo riesgo de desarrollar infecciones que la población general correspondiente a su edad y sexo, y además el derivado de su situación de inmunosupresión.

Los factores que determinan el riesgo de infección en estos pacientes pueden clasificarse en tres grupos: dependientes del receptor, relacionados con el trasplante y relacionados con la inmunosupresión. En la tabla 2 se recogen los factores más importantes incluidos en cada grupo.

**Tabla 2:** Factores predisponentes de infección en receptor de trasplante de órgano sólido.

Factores dependientes del receptor
<p>Edad</p> <p>Enfermedad que condiciona el trasplante (DM, lupus eritematoso sistémico).</p> <p>Enfermedades concomitantes-comorbilidad (HTA, EPOC, cardiopatía, hepatopatía).</p> <p>Ausencia de inmunidad específica frente a CMV, VHS, VVZ, VEB.</p> <p>Colonización del receptor por bacterias, hongos.</p> <p>Infección latente por tuberculosis, CMV, VHS, VVZ, sífilis, virus BK.</p> <p>Exposiciones de riesgo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempo prolongado de hospitalización previo al trasplante prolongado (exposición a microorganismos multirresistentes y flora nosocomial).</li> <li>- Viajes o procedencia de regiones endémicas para <i>Histoplasma</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i>, <i>Leishmania</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Strongyloides</i>, HTLV-1.</li> <li>- Exposiciones ambientales: jardinería, animales.</li> </ul> <p>Tratamiento previo con antimicrobianos, esteroides, inmunosupresores.</p>
Factores relacionados con el trasplante
<p>Variables quirúrgicas: duración de la cirugía, tipos de anastomosis del injerto, experiencia del equipo quirúrgico.</p> <p>Daño del injerto durante la preservación.</p> <p>Colonización del injerto por hongos, bacterias.</p> <p>Infección activa en el donante no detectada antes del trasplante (bacteriemia, sífilis, <i>T.cruzi</i>, HTLV-1, LCMV, rabia, virus del Nilo Occidental).</p> <p>Infección latente del injerto por tuberculosis, CMV, VEB, VVZ.</p> <p>Instrumentación postquirúrgica: ventilación mecánica, sondaje vesical, drenajes, catéteres intravasculares.</p> <p>Tiempo prolongado en UCI tras el trasplante, necesidad de aminas vasoactivas, insuficiencia renal post-trasplante.</p> <p>Hospitalización prolongada tras el trasplante (riesgo de infecciones nosocomiales).</p> <p>Necesidad de nueva intervención quirúrgica o retrasplante.</p>
Factores relacionados con la Inmunosupresión
<p>Tipo de inmunosupresión</p> <p>Intensidad de la inmunosupresión</p> <p>Duración de la inmunosupresión</p> <p>Episodios de rechazo que precisan una inmunosupresión más intensa</p> <p>Infección por virus inmunomoduladores (CMV, VEB, VHC, VHB, VIH)</p>
<p>CMV: citomegalovirus, VEB: virus Epstein-Barr, VHC: virus hepatitis C, VHB: virus hepatitis B, VIH: virus inmunodeficiencia humana, VVZ: virus varicela-zóster, LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria, HTLV-1: virus linfotrópico de células T humanas, DM: diabetes <i>mellitus</i>, HTA: hipertensión arterial, EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.</p>

#### 1.4.2 Origen de las infecciones

Los microorganismos patógenos en el receptor de un trasplante de órgano sólido pueden tener distinta procedencia: a) el propio paciente (flora

endógena de piel y mucosas; reactivación de infecciones latentes como toxoplasmosis, virus del grupo herpes o tuberculosis entre otras); b) la flora exógena que puede infectar al paciente a través de distintas vías como la aérea, digestiva o la manipulación a la que es sometido durante su hospitalización (sondaje vesical, colocación de catéteres intravasculares, drenajes quirúrgicos, manos del personal sanitario); c) la contaminación o infección latente del injerto; y d) la contaminación de hemoderivados administrados al paciente.

#### 1.4.3 Cronología de las infecciones en el post-trasplante renal

Las pautas de inmunosupresión, la profilaxis antiinfecciosa y la técnica quirúrgica empleada determinan una secuencia temporal bien definida en el desarrollo de infecciones tras el trasplante renal [4, 52]. Las infecciones que ocurren fuera de su periodo habitual pueden indicar una inmunosupresión excesiva o un riesgo epidemiológico elevado. Se debe tener en cuenta que con el tratamiento del rechazo agudo o la intensificación de la inmunosupresión el paciente trasplantado vuelve al periodo de mayor riesgo de infecciones oportunistas.

Resulta útil dividir el curso post-trasplante en tres periodos según el riesgo de infección por patógenos específicos en cada uno de ellos (figura 7):

##### *a) Periodo precoz: primer mes tras el trasplante*

Aunque las dosis de inmunosupresores son máximas en este momento, el riesgo de infecciones oportunistas depende más de la inmunosupresión mantenida en el tiempo; por eso dichas infecciones suelen estar ausentes en este periodo. Predominan, pues, las infecciones derivadas del donante (fundamentalmente bacterianas o fúngicas que éste pudiera presentar en el momento inmediatamente anterior a la donación, aunque también se han comunicado casos de transmisión de sífilis, virus herpes simple, HTLV-1, LCMV [53] e incluso rabia [54], entre otras) y las infecciones nosocomiales.

*b) Periodo intermedio: desde el segundo al sexto mes tras el trasplante*

En este periodo ya se hace patente el efecto del tratamiento inmunosupresor. Gracias a la profilaxis con trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol) se previenen la mayoría de las infecciones del tracto urinario y las oportunistas por patógenos como *P.jirovecii*, *Listeria*, *Toxoplasma gondii* o especies de *Nocardia* sensibles a cotrimoxazol. Igualmente, pueden ocurrir en este momento otras infecciones oportunistas como aspergilosis, infecciones por hongos endémicos, criptococosis o tuberculosis. Además pueden reactivarse infecciones latentes (*Strongyloides*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*). En cuanto a las infecciones virales, la profilaxis antiviral puede prevenir la infección por virus del grupo herpes y la reactivación del virus de la hepatitis B, pero no evita la infección por otros virus patógenos como el poliomavirus BK, adenovirus, virus de la gripe o la recurrencia del virus de la hepatitis C.

*c) Periodo tardío: después del sexto mes tras el trasplante*

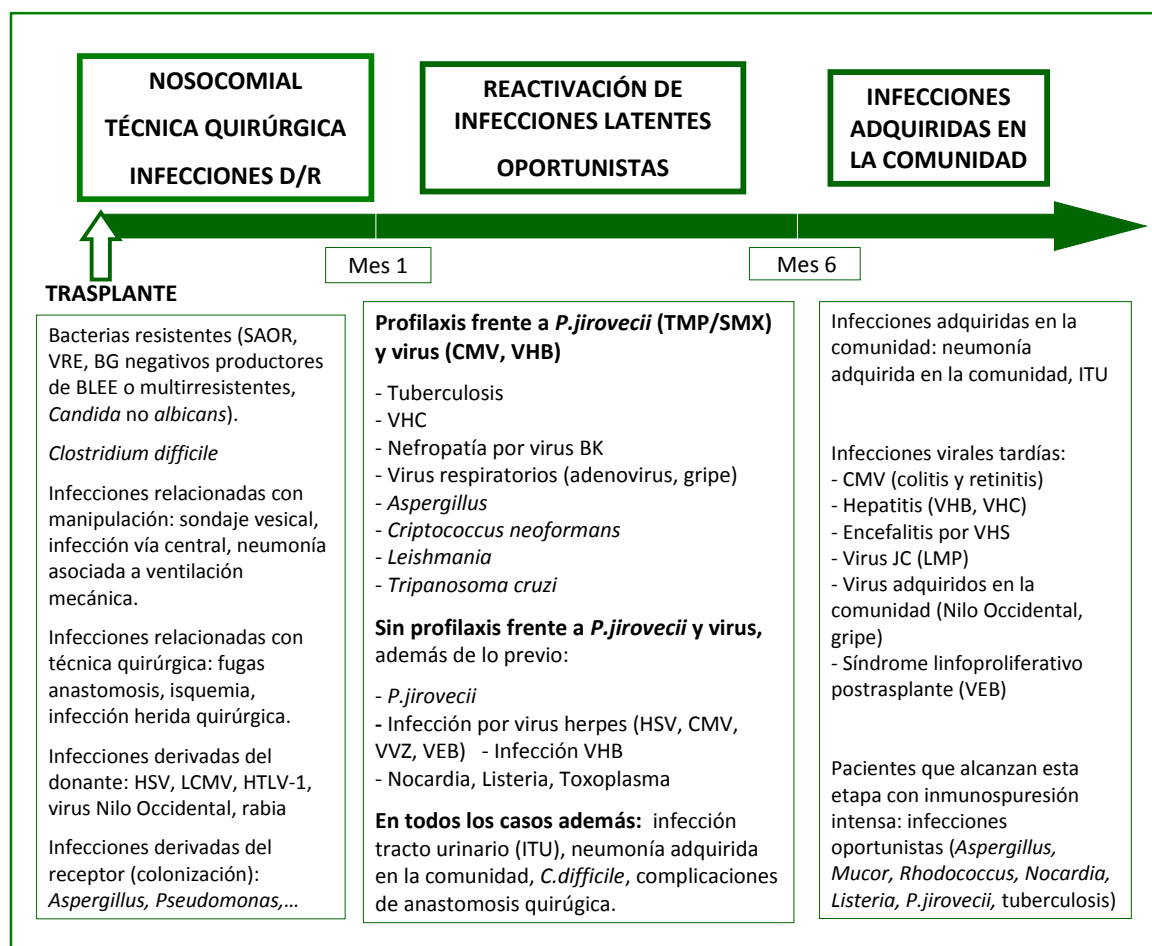
En general, el riesgo de infección disminuye a partir del sexto mes, ya que en ese momento se reduce el tratamiento inmunosupresor en trasplantados con función del injerto satisfactoria, que no han presentado episodios previos de rechazo ni problemas postquirúrgicos relevantes. Sin embargo, estos pacientes tienen un riesgo persistente de desarrollar infecciones adquiridas en la comunidad, que habitualmente cursarán con un cuadro clínico más grave que en el enfermo inmunocompetente.

Por otra parte, existe un grupo de pacientes con infecciones crónicas o progresivas por determinados virus (CMV, VHC, VEB) que a la larga pueden causar daño progresivo del injerto o el desarrollo de una enfermedad maligna, como la enfermedad linfoproliferativa post-trasplante relacionada con el VEB o el cáncer de piel o anogenital asociados con papilomavirus [55, 56]

Además, aproximadamente un 5% de los trasplantados alcanzan este periodo con un exceso de inmunosupresión debido al tratamiento de

episodios de rechazo previos, por lo que continúan expuestos al desarrollo de infecciones oportunistas [57].

**Figura 7:** Cronología de las infecciones en el post-trasplante. Modificado de Fishman et al [4].



#### 1.4.4 Prevención de las infecciones

Puesto que la infección en el paciente trasplantado supone una elevada morbilidad, con repercusión sobre la supervivencia del injerto y del propio paciente, es fundamental su prevención. El conocimiento de la epidemiología y factores de riesgo de las infecciones en este grupo de pacientes ha conducido al desarrollo de diversas estrategias de profilaxis. Entre ellas

destacan: la vacunación antigripal y antineumocócica; el tratamiento de la enfermedad tuberculosa latente en caso de que la intradermorreacción de Mantoux sea positiva; la administración de trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) durante los primeros seis a 12 meses post-trasplante; la profilaxis o tratamiento anticipado de la infección por CMV [58]; la profilaxis de infección fúngica invasiva; y la profilaxis quirúrgica adaptada a las exposiciones de cada paciente (colonización, patrones de resistencia de flora hospitalaria, bacteriemia en el donante). El desarrollo de estrategias que permitan conocer el estado neto de inmunosupresión del paciente trasplantado es fundamental para identificar aquellos con mayor riesgo de infección que pudieran beneficiarse de estrategias de profilaxis más prolongadas en el tiempo.

### **1.5. Estrategias de monitorización de la inmunosupresión en trasplantados renales**

Hasta la fecha no existe una única prueba que determine adecuadamente el estado neto de inmunosupresión y que, por lo tanto, permita determinar el riesgo individual de cada paciente trasplantado de desarrollar una infección. No obstante, se dispone de varias estrategias que intentan mostrar el grado de inmunidad del receptor de un trasplante renal.

#### **1.5.1 Estrategias habituales de monitorización de la inmunosupresión en el trasplantado renal**

Las estrategias más ampliamente aceptadas en la monitorización inmune de los pacientes con trasplante renal son la estimación de la función del injerto a través de parámetros como la creatinina plasmática (o el aclaramiento de creatinina), cuyo deterioro podría indicar un rechazo y, por lo tanto, un estado de inmunosupresión insuficiente; y la determinación de las concentraciones plasmáticas de los fármacos inmunosupresores [59].

Pese a la confianza que han mostrado los clínicos en la monitorización de las concentraciones plasmáticas de fármacos inmunosupresores para determinar el estado de inmunocompetencia de los pacientes trasplantados, esta aproximación es limitada al ser de naturaleza unidimensional, sin tener en cuenta variables farmacocinéticas, farmacodinámicas ni clínicas que modulan la actividad fenotípica de los protocolos actuales de inmunosupresión [60, 61]. De hecho, en la mayoría de estudios no se ha observado correlación entre las concentraciones plasmáticas de los fármacos inmunosupresores y el desarrollo de infección [62-64]. Así, Israeli *et al* [64] observaron que las concentraciones de inhibidores de calcineurina (CNI) determinadas el mismo día que un episodio de infección estaban en rango o incluso en niveles infraterapéuticos hasta en un 68% de las determinaciones.

Por otra parte, no está claro que las concentraciones de fármacos se correlacionen con su eficacia inmunosupresora, habiéndose observado discordancias entre distintos estudios, especialmente para agentes distintos de los CNI [65-68].

Por todo ello, y ya que es posible que un paciente con concentraciones en rango esté tanto en riesgo de infección como de rechazo al mismo tiempo, el valor principal de la monitorización de fármacos es evitar la toxicidad farmacológica y comprobar el cumplimiento terapéutico del paciente [69]. Así, la *Food and Drug Administration* (FDA) concluye en sus guías que los niveles aislados de CNI no pueden ser empleados como único indicador para realizar cambios en el régimen de tratamiento inmunosupresor [70].

#### 1.5.2 Estrategias dirigidas a conocer el estado neto de inmunosupresión del paciente trasplantado

Con la intención de solventar la carencia de las estrategias previas y tratar de conocer mejor el estado neto de inmunosupresión del paciente, en los últimos años se ha desarrollado un repertorio de técnicas de monitorización inmune



que intenta estratificar el riesgo individual de cada paciente trasplantado para desarrollar infección y, eventualmente, proporcionar la base para una inmunosupresión dirigida [71,72].

La respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, es el resultado de una compleja interacción entre mediadores de señal solubles o ligados a la membrana celular y poblaciones celulares especializadas, que desencadena numerosos mecanismos efectores [73]. Las diferentes estrategias propuestas para la monitorización inmunológica persiguen reducir, al menos en parte, la complejidad de este proceso a un parámetro o grupo de parámetros que, medidos de forma regular, puedan proporcionar una visión dinámica del estado neto de inmunosupresión del sujeto, con la consiguiente correlación con el riesgo de infección o rechazo [72]. Desde el momento en que el sistema inmune responde rápidamente y está en continuo cambio, esta monitorización regular y repetida parece fundamental para entender cualquier respuesta inmune [74].

Idealmente, el ensayo en el que se base esta monitorización debe ser fiable, suficientemente sensible y específico, altamente reproducible, relativamente económico y ofrecer resultados disponibles en un corto periodo de tiempo, para permitir al clínico ajustar la inmunosupresión lo antes posible para prevenir complicaciones [75].

Los ensayos actuales pueden clasificarse en dos grupos: los basados en una monitorización no específica de un patógeno determinado y aquellos que determinan la respuesta inmune a un patógeno concreto.

*a) Métodos de monitorización no específicos de un patógeno determinado*

Agrupan a aquellas pruebas que evalúan la funcionalidad de una rama determinada del sistema inmune mediante ensayos sin especificidad antigénica, siendo el evento predicho la infección global o un tipo genérico de infección (bacteriana, viral o fúngica). La naturaleza del biomarcador

suele ser meramente cuantitativa – por ejemplo, la cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, inmunoglobulinas o factores del complemento – o puede proporcionar una valoración funcional – como la liberación intra-linfocitaria de adenosina trifosfato (ATP) bajo la estimulación de un mitógeno inespecífico (fitohemaglutinina).

En cuanto a la monitorización a través de biomarcadores cuantitativos varios estudios han mostrado su utilidad en la predicción del desarrollo de infecciones.

- Concentración de inmunoglobulinas séricas

Aproximadamente un 15% de pacientes trasplantados desarrollan hipogammaglobulinemia (HGG) grave (IgG < 400 mg/dl) durante el primer año post-trasplante [76]. Los mecanismos responsables no están del todo claros y se ha postulado un origen multifactorial que incluye una disminución del número de linfocitos TCD4<sup>+</sup>, con el consiguiente impacto sobre la activación de los linfocitos B [49]; el uso de MFM por su efecto deletéreo sobre la función de los linfocitos B [77, 78]; y la administración de dosis altas de esteroides [79]. Puesto que la inmunidad humoral juega un papel fundamental en la defensa frente a la infección bacteriana, la HGG podría predecir el desarrollo de dichas infecciones en el paciente trasplantado. Esto se ha demostrado en varios estudios en los que se correlacionó la hipogammaglobulinemia IgG post-trasplante con un aumento global en la incidencia de infecciones bacterianas [76], bacteriemia [47] e infección por *Clostridium difficile* [80]; con una mayor incidencia cuanto menor fue la cifra de IgG [47]. Dado que la HGG es reversible con la administración de gammaglobulinas intravenosas se han llevado a cabo algunos estudios en los que la administración preventiva de inmunoglobulinas intravenosas parece prometedora en la reducción de la incidencia de infección sin suponer mayor riesgo de rechazo [81, 82]. Esto, junto con la disponibilidad y bajo coste de esta

determinación, hace que la monitorización de este marcador de la respuesta inmune humoral sea muy ventajosa.

- Concentraciones de los factores del Complemento

Dada la relevancia del sistema del Complemento en la fagocitosis, la inflamación y la lisis celular, la medida de los valores séricos de sus componentes proteicos puede reflejar el grado de inmunosupresión. De hecho, un estudio prospectivo en 270 receptores de trasplante renal observó que la presencia de hipocomplementemia en el primer mes post-trasplante era un factor de riesgo independiente para el desarrollo posterior de infecciones bacterianas [46]. Igualmente, otros estudios han mostrado hallazgos comparables en receptores de trasplante hepático [83] y cardíaco [84]. Pese a la sencillez de la determinación de los factores del complemento, la cuantificación de sus valores no proporciona información sobre su funcionalidad por lo que no siempre valores normales de estos factores se asocian con un correcto funcionamiento de la inmunidad innata.

- Cuantificación de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

La depleción de linfocitos tras la administración de globulina antitimocítica (ATG) o alemtuzumab es un factor de riesgo bien establecido para el desarrollo de infecciones en el post-trasplante [45]. Partiendo de esta base, se han realizado estudios buscando una correlación entre la cinética de subpoblaciones linfocitarias como el recuento de CD4<sup>+</sup> en sangre periférica y el desarrollo de infecciones oportunistas. Al igual que ocurre en el paciente VIH, algunos autores han mostrado que pacientes trasplantados con recuentos de CD4<sup>+</sup> inferiores a 200 células/μL presentan un riesgo mayor de desarrollar infecciones oportunistas, principalmente por CMV [85] y *P.jirovecii* [86-88]. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se ha sugerido que la dinámica de las subpoblaciones linfocitarias tras el trasplante podría ser de utilidad para guiar la duración de la profilaxis, de un modo similar al

establecido para los pacientes VIH [87], si bien se necesitan más estudios para validar esta estrategia.

*b) Métodos de monitorización específicos de un patógeno determinado*

Las estrategias de monitorización específicas de patógeno se basan en ensayos específicos de antígeno que estiman la magnitud y funcionalidad de la respuesta inmune adaptativa generada por los linfocitos B y T contra un patógeno determinado, habitualmente cuantificando las citoquinas producidas por las células T CD4<sup>+</sup> Th1 efectoras –por ejemplo, IFN $\gamma$  o factor de necrosis tumoral  $\alpha$ – tras el contacto con un antígeno conocido de CMV, VEB o virus BK.

Las estrategias más desarrolladas han sido aquellas específicas de CMV, al ser este virus una de las causas principales de morbilidad en receptores de trasplante de órgano sólido, tanto por el daño directo que ocasiona la enfermedad por CMV (hepatitis, retinitis, neumonitis) como por el impacto sobre la supervivencia del injerto y del paciente a través de su efecto inmunomodulador.

Aquellos pacientes que no presenten inmunidad específica frente a CMV, bien porque nunca han estado en contacto con él, o bien porque están excesivamente inmunosuprimidos, tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad tras la primoinfección (por ejemplo: receptor seronegativo de un órgano de donante seropositivo para CMV; o receptor seropositivo que se infecta por una cepa distinta de CMV) o al reactivarse el virus latente.

Por ello, la monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV puede ser útil al permitir individualizar las estrategias de profilaxis y monitorización de la viremia. Así, pacientes con una inmunidad adecuada frente a CMV podrían considerarse de bajo riesgo y, por lo tanto, no sería necesaria la administración de profilaxis antiviral ni la monitorización de la viremia. Por el contrario, aquellos pacientes incapaces de generar una respuesta específica frente a CMV, sí serían objeto de tales medidas [89].

En las tablas 3 y 4 se resumen las distintas técnicas de monitorización de la inmunosupresión disponibles en la actualidad.

**Tabla 3:** *Métodos de monitorización inmune no específicos de patógeno en pacientes trasplantados. Modificado de Fernández-Ruiz M et al [72].*

<i>Tipo de ensayo</i>	<b>Inmunoglobulinas séricas</b>	<b>Factores del complemento (C3, C4, MBL)</b>	<b>Subpoblaciones linfocitarias periféricas</b>	<b>CD30 soluble</b>	<b>iATP en células T CD4 (Immuknow®)</b>
<i>Muestra requerida</i>	Suero	Suero	Sangre completa	Suero	Sangre completa
<i>Ensayo</i>	Nefelometría	Nefelometría o ELISA	Citometría de flujo	ELISA	Cuantificación del iATP liberado por células TCD4+ estimuladas con fitohemaglutinina
<i>Análisis funcional</i>	No	No	No	Sí	Sí
<i>Ventajas</i>	Económico y fácil de realizar. Posible tratamiento mediante la terapia sustitutiva con inmunoglobulinas intravenosas	Económico y fácil de realizar. Posible “genotipar” las variantes del gen mbl2	Fácil de realizar (medios automatizados)	Fácil de realizar. Ensayo comercial. Se requiere pequeño volumen de suero (25µL)	Ensayo comercial aprobado por la FDA Estandarizado. Numerosos estudios en relación al ensayo
<i>Limitaciones</i>	Ausencia de puntos de corte estandarizados. No proporciona información sobre la funcionalidad de la respuesta humoral	Ausencia de puntos de corte estandarizados. No proporciona información sobre la funcionalidad del sistema del complemento	Ausencia de puntos de corte estandarizados. No proporciona información funcional sobre la respuesta celular	Pocos estudios sobre la capacidad de predicción de infecciones del ensayo, con resultados discordantes	Modestos VPP y VPN en la predicción de infección en los estudios realizados Alto coste relativo No válido si se almacena la muestra tiempo prolongado antes de realizar el test

FDA: Food and Drug Administration, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo

**Tabla 4.** *Métodos de monitorización de la respuesta inmune específica frente a CMV mediada por células T en receptores de trasplante de órgano sólido. Modificado de Fernández-Ruiz M et al [72].*

<i>Tipo de ensayo</i>	<b>QuantiFERON®- CMV</b>	<b>ELISpot</b>	<b>Tinción intracelular de citocinas</b>	<b>Tinción de tetrámeros MHC</b>
<i>Muestra requerida</i>	Sangre completa (3-5ml)	Células mononucleares de sangre periférica (10 ml)	Células mononucleares de sangre periférica o sangre completa (1-2 ml)	Células mononucleares de sangre periférica (0,5-1 ml)
<i>Tiempo en obtener resultados</i>	24 h	24-48 h	8-10 h	1-2 h
<i>Antígeno</i>	Mezcla de 22 péptidos diferentes (pp65, pp50, IE-1, IE-2, gB) de CMV	Péptido individual/ biblioteca de péptidos/ lisado de virus completo/ células dendríticas inmaduras infectadas con CMV (VR-1814)	Péptido individual/ biblioteca de péptidos/ lisado de virus completo/ células dendríticas inmaduras infectadas con CMV (VR-1814)	Péptido individual (pp65, pp50, IE-1) de CMV
<i>Análisis funcional</i>	Sí	Sí	Sí	No (a menos que se asocie con tinción intracelular de citocinas)
<i>Caracterización fenotípica</i>	No	No	Sí	Sí
<i>Diferenciación entre células T CD8+ y CD4+</i>	No (fundamentalmente detecta células T CD8)	No	Sí	Sí
<i>Se requiere conocer el epítipo</i>	No	No	No	Sí

<i>Se requiere conocer el HLA del individuo</i>		No	Sí
<i>Ventajas</i>	Sencillo y estandarizado Aprobado por la CE Experiencia clínica creciente	Aprobado por la CE Posible congelar muestras y enviarlas a laboratorio de referencia	Patrón oro, la mayoría de datos disponibles son con esta técnica Posible congelar muestras y enviarlas a laboratorio de referencia  Aprobado por la CE Altamente específico Ofrece resultados en poco tiempo
<i>Limitaciones</i>	No diferencia entre células T CD8+ y CD4+ Sensible a la linfopenia (alta tasa de resultados indeterminados en pacientes tratados con ATG) Limitado a HLA frecuentes	Técnica no estandarizada. No puntos de corte definidos. Necesidad de células periféricas mononucleares purificadas y acceso a un lector de ELISpot No diferencia entre células T CD8+ y CD4+ No aprobado por la FDA	Muy laborioso Técnica no estandarizada Necesidad de células periféricas mononucleares purificadas y acceso a un citómetro de flujo. No aprobado por la FDA

---

CE: Comunidad Europea, ATG: globulina antitimocítica, FDA: Food And Drug Administration,



## **1.6 Monitorización de la inmunosupresión mediante la determinación de la concentración intracelular de ATP (iATP) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina**

Hasta la fecha, la determinación de las concentraciones intracelulares de ATP en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica tras su estimulación inespecífica con fitohemaglutinina (PHA) es una de las estrategias de monitorización funcional mejor establecida en receptores de trasplante de órgano sólido. Las células T CD4<sup>+</sup> participan en muchos de los mecanismos implicados en el rechazo por lo que son la diana de la mayoría de los fármacos inmunosupresores. La determinación de su funcionalidad bajo el influjo del tratamiento inmunosupresor puede, por lo tanto, constituir un marcador subrogado del grado de inmunidad del paciente trasplantado [90]. La existencia de un ensayo comercial (Immuknow® de Cylex™/Viracor-IBT laboratories) ha facilitado el desarrollo de esta estrategia [91].

### **1.6.1 Medición de la concentración intracelular de ATP mediante el test comercial Immuknow®**

El ensayo comercial Immuknow®, Cylex™/Viracor-IBT laboratories, fue aprobado en 2002 por la FDA para detectar la respuesta inmune mediada por células en pacientes inmunosuprimidos [91]. El test mide la capacidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (T helper-Th) de responder a una estimulación mitogénica inespecífica *in vitro* (fitohemaglutinina), cuantificando la cantidad de adenosina trifosfato intracelular (iATP) producido por dichas células. Al realizarse en sangre completa y, por lo tanto, bajo la presencia continua de los fármacos inmunosupresores, permite apreciar el impacto conjunto de dichos fármacos y la condición subyacente del paciente.

La exposición de las células T a la fitohemaglutinina conduce a su activación metabólica y expansión policlonal, un proceso en el que la síntesis y liberación de ATP precede a la expresión de receptores de membrana, producción de citoquinas (CK) y otros eventos subsecuentes [73]. El

incremento de las concentraciones de iATP tras la estimulación ofrece una aproximación al grado de funcionalidad de la respuesta inmune celular [92].

Técnicamente, es fundamental procesar la muestra en menos de 24 horas tras su extracción, puesto que se ha demostrado que el retraso en el procesamiento de muestras de sangre desde su extracción hasta la realización del ensayo causa una variabilidad de los resultados, con una reducción significativa de los valores de iATP [93], lo que puede llevar a extraer conclusiones erróneas en los estudios.

#### 1.6.2 Patrón de concentraciones de iATP

El patrón de las concentraciones de iATP se determinó a partir del estudio poblacional de Kowalski *et al* [94] en el que se compararon los resultados del ensayo Immuknow® en controles sanos y receptores de trasplante de órgano sólido. Se establecieron así tres categorías para definir la respuesta inmune mediada por células del paciente en función de los valores de iATP: fuerte  $\geq 525$  ng/ml, moderada 226-524 ng/ml y débil  $\leq 225$  ng/ml. *A priori* una respuesta fuerte indicaría que el paciente está infrainmunosuprimido y, por lo tanto, con un riesgo aparentemente mayor de desarrollar rechazo. Por el contrario, una respuesta débil reflejaría un alto grado de inmunosupresión y, en ese caso, una mayor susceptibilidad a la infección [94,95].

#### 1.6.3 Correlación entre las concentraciones de iATP y el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Las concentraciones de iATP muestran una pobre correlación con el recuento total de linfocitos T CD4+, como muestran varios estudios en los que, al trazar una gráfica con las concentraciones de iATP como función del número absoluto de linfocitos T CD4+ en pacientes trasplantados, el coeficiente de correlación de Pearson presenta un valor  $r^2 < 0,1$ , lo que no permite concluir

que haya una asociación entre el número absoluto de CD4+ y su actividad funcional medida por los valores de iATP [74, 94, 96-98]. Asimismo, tampoco se ha encontrado correlación entre los valores de iATP y las concentraciones plasmáticas de inhibidores de la calcineurina [64, 94, 95, 98-100].

#### 1.6.4 Concentración intracelular de ATP en la predicción de complicaciones post-trasplante

Se han realizado varios estudios para tratar de determinar el valor real de la concentración de iATP en linfocitos TCD4<sup>+</sup> estimulados con PHA, medida mediante el ensayo Immuknow®, en la predicción de complicaciones post-trasplante. Hasta la fecha, los resultados sobre su capacidad para predecir el riesgo de desarrollar rechazo o infección han sido contradictorios.

##### *a) Concentración de iATP en la predicción de rechazo*

El papel del sistema inmune adquirido en el rechazo del órgano trasplantado está bien establecido y constituye la base del tratamiento inmunosupresor, cuya diana fundamental son los linfocitos T. Puesto que la determinación de la concentración de iATP tras la estimulación inespecífica de los linfocitos T es un reflejo de su funcionalidad, se ha tratado de buscar una asociación entre concentraciones elevadas de iATP y un mayor riesgo subsecuente de rechazo agudo, teniendo en cuenta que las células T activadas pueden aparecer en sangre periférica antes de afectar al injerto [101]. No obstante, existe discordancia en los distintos estudios publicados en este sentido, por lo que se cuestiona la utilidad del ensayo Immuknow® en la predicción de rechazo agudo en el receptor de un trasplante de órgano sólido.

En el estudio multicéntrico llevado a cabo por Kowalski *et al* [102] en 504 pacientes trasplantados, el valor mediano de iATP en los 39 rechazos que tuvieron lugar durante el seguimiento fue 488 ng/ml, cifra significativamente superior al valor mediano de iATP de aquellos

pacientes que permanecieron estables (249 ng/ml). En función de sus datos, concluyeron que un receptor con un valor de iATP mayor de 700 ng/ml tenía un riesgo 30 veces superior de desarrollar un rechazo agudo que un receptor con valores de iATP inferiores. Del mismo modo, otros autores, como Israeli *et al* [64] en trasplantados cardíacos o Cadillo-Chávez *et al* [103], Pérez-Flores *et al* [98] o Zhou *et al* [104] en renales, han hallado resultados similares. Incluso en algunos trabajos se ha observado un incremento de las concentraciones de iATP en el momento de rechazo en comparación con las del mismo paciente en el momento libre de evento [64, 105]. Un estudio reciente de Myslik *et al* [106] ha demostrado, además, que los valores de iATP superiores a 300 ng/ml en el momento inmediatamente anterior al trasplante renal pueden predecir el desarrollo de rechazo agudo en el periodo post-trasplante, con diferencias estadísticamente significativas en el número de episodios de rechazo agudo entre este grupo y aquellos receptores con iATP inferior a 300 ng/ml previamente al trasplante. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Reinsmoen *et al* [107] en su cohorte de 126 receptores de trasplante renal en los que valores de iATP superiores a 375 ng/ml en el momento pre-trasplante suponían una probabilidad 3,67 veces mayor de presentar posteriormente un rechazo agudo ( $p=0,03$ ).

Sin embargo, estos hallazgos sobre la capacidad predictiva de la medición de iATP en la predicción de rechazo agudo no se han confirmado en otros estudios en los que valores elevados de iATP no se asociaron con mayor riesgo de rechazo [95, 108] o en los que pacientes con rechazo agudo presentaron valores medios de iATP similares [101] o incluso más bajos que pacientes estables [109]. De hecho, el propio estudio de Myslik *et al* [106] no pudo demostrar que los valores absolutos de iATP determinados en el momento post-trasplante tuvieran buen valor predictivo en cuanto a la capacidad de predecir rechazo.

Estas discordancias se han resumido en tres metanálisis [110-112] que muestran una sensibilidad baja del ensayo Immuknow® (0,43; 0,51 y 0,65 respectivamente) para predecir el desarrollo de rechazo agudo, si bien entre los estudios incluidos existía una importante heterogeneidad en cuanto al diseño, el tipo de trasplante de órgano sólido, los protocolos de inmunosupresión empleados, el número de determinaciones de iATP, y el momento en la determinación de iATP, habitualmente coincidente con el evento clínico [113].

Asimismo, se ha tratado de aplicar la determinación seriada de la concentración de iATP en la monitorización del riesgo de rechazo con la retirada progresiva de la inmunosupresión, al considerarse un biomarcador de la evolución de la recuperación de la respuesta inmune. Los resultados de los estudios realizados en este sentido también han sido discordantes [90, 114] sin quedar clara la aplicabilidad de esta prueba, puesto que el rechazo puede ocurrir aunque la respuesta inmune no sea fuerte.

*b) Concentración de iATP en la predicción de infecciones*

En cuanto a la correlación entre los valores de iATP y el riesgo de infección en receptores de trasplante de órgano sólido, varios estudios han tratado de determinarla, con conclusiones discordantes acerca de la utilidad de la medición de la concentración de iATP a la hora de predecir la aparición posterior de una complicación infecciosa (tabla 5).

Los primeros estudios realizados observaron que en el momento de una infección activa los valores de iATP eran bajos. Así, autores como Thai o Sánchez-Velasco hallaron valores de iATP significativamente menores en pacientes con infección frente a aquellos estables [97,115]. Igualmente, Bhorade *et al* [99] observaron que 15 de 57 receptores de trasplante de pulmón desarrollaron un episodio de infección con valores de iATP en ese momento significativamente inferiores con respecto a los no infectados

(111 ng/ml vs 283 ng/ml,  $p < 0,0001$ ). Y, a su vez, Valero *et al* [116] cuantificaron las concentraciones de iATP en 89 trasplantados renales y observaron diferencias significativas en la tasa de infección en función de la respuesta inmune, que fue del 50% en pacientes con una respuesta inmune baja ( $< 225$  ng/ml), del 37,7% en aquellos con una respuesta moderada (225-525) y del 15,38% en los casos con respuesta inmune fuerte ( $> 525$  ng/ml).

Además, se ha visto que, en comparación con los momentos de estabilidad, un mismo paciente experimenta un descenso en las concentraciones de iATP en el momento en que presenta una infección. Así, Israeli *et al* [64] observaron que los valores de iATP experimentaron un descenso medio de 55% sobre la determinación previa durante el periodo de quiescencia. Y, en el ya mencionado estudio observacional multicéntrico realizado por Kowalski *et al* [102], que incluyó 504 receptores de trasplante de órgano sólido (renal, hepático, cardíaco e intestinal) con determinación de un total de 1833 valores de iATP (durante periodos de estabilidad clínica y coincidiendo con un evento adverso), se observó que las cifras de iATP en el momento de la infección eran significativamente menores que en periodos de estabilidad. Este estudio concluyó que valores por debajo de 25 ng/ml se asociaban con un riesgo 12 veces mayor de desarrollar infección (IC 95% 4-36) que valores más elevados. Otros estudios han mostrado resultados similares, con un riesgo relativo de infección entre 4 y 7 para cifras de iATP menores de 100 ng/ml en trasplantados pancreáticos que recibieron alemtuzumab como tratamiento de inducción [115], y de 4,4 para valores menores de 224 ng/ml en el caso de trasplantados renales [103].

Una limitación de todos estos estudios es la indicación de la prueba en función de la sospecha clínica de infección, con determinación de la concentración de iATP en el momento del evento. En todos estos casos, la atribución de causalidad puede estar sesgada ya que el patógeno por sí

mismo puede ser responsable de la disminución de los valores de iATP a través de mecanismos de extenuación de la célula T [117].

Para salvar esta limitación se realizaron otros estudios en los que se determinaba el valor de iATP y se registraban los eventos posteriores. Autores como Kobashigawa *et al* [101], Millán *et al* [90] o Pérez-Flores *et al* [98] cuantificaron los valores de iATP durante las visitas de rutina en el post-trasplante, sin un esquema de monitorización claramente definido, y compararon los valores medios de iATP entre los pacientes que posteriormente desarrollaron un episodio de infección y los que se mantuvieron estables. En los tres estudios se observaron claras diferencias entre los dos grupos, con valores de iATP significativamente inferiores entre los pacientes que a lo largo del tiempo desarrollaban una infección.

Sin embargo, otros estudios posteriores, con un tiempo de seguimiento más largo y con un esquema de monitorización preestablecido igual para todos los pacientes, no han demostrado esta correlación. Así, no se han encontrado diferencias significativas en los valores de iATP entre los pacientes que posteriormente desarrollaron una infección y los que no lo hicieron, ni mayor tasa de infección entre los trasplantados con cifras de ATP < 225 ng/ml [109, 118]. Gupta *et al* [95] han llegado incluso a concluir que la medición de iATP no es una herramienta suficientemente sensible ni específica para ser usada en la clínica como predictor del riesgo de infección, si bien la pauta de monitorización empleada en su estudio no siguió un esquema preestablecido e incluyó episodios infecciosos que ocurrían hasta 6 meses después de la determinación de iATP.

En este sentido, tres meta-análisis recientes [110-112] sobre la utilidad de la cuantificación de iATP han llegado a conclusiones opuestas. Según Ling *et al* [110] los valores de iATP no se correlacionan bien con el riesgo de infección con una sensibilidad y especificidad bajas (0,58 y 0,69 respectivamente), tampoco el meta-análisis de Wang *et al* [111] apoya el

uso del ensayo Immuknow® en la predicción del desarrollo de infecciones en pacientes trasplantados, con una sensibilidad de la prueba de 0,51. Por el contrario, Rodrigo *et al* [112] encuentran una sensibilidad y especificidad del 83,8% y 75,3%, respectivamente, con un área bajo la curva ROC de  $0,824 \pm 0,034$ , por lo que infieren que los valores de iATP tienen una buena capacidad para predecir infección.

Estos resultados contradictorios pueden deberse, como mencionamos en el apartado previo, a que la mayoría de los estudios son retrospectivos, con un seguimiento limitado, heterogéneos en su diseño y, a menudo, incluyen distintos tipos de trasplante de órgano sólido en los análisis pese a que los protocolos de inmunosupresión y los riesgos de eventos clínicos difieren sustancialmente entre ellos.

Además, la mayoría de los estudios incluidos en los meta-análisis utilizan determinaciones puntuales de iATP que pueden verse modificadas por factores que suponen un riesgo de confusión como la propia infección. Asimismo, una única determinación no permite evaluar el estado cambiante del sistema inmune a lo largo del tiempo, de lo que se deduce que un valor aislado de iATP pudiera no tener buena capacidad para predecir el riesgo de infección a largo plazo [74], sobre todo si el tiempo transcurrido entre la cuantificación de iATP y el evento es prolongado. Idealmente se requerirían mediciones seriadas para evaluar la tendencia del iATP en los meses posteriores al trasplante y poder así dilucidar los efectos de la inmunosupresión a largo plazo [105, 119]. Esta monitorización según un esquema preestablecido podría proporcionar información útil de cara a un ajuste de la inmunosupresión, con reducción preventiva de la misma para evitar infecciones [120].

Por otra parte, la contribución relativa de la respuesta de la célula T en el control del proceso infeccioso difiere según la naturaleza del patógeno, por lo que es probable que el análisis de la infección como un evento global, y no como un subanálisis en función del patógeno, subestime el



valor predictivo del ensayo. De hecho, varios estudios han sugerido el valor del ensayo Immuknow® para predecir el desarrollo de infecciones específicas, fundamentalmente por CMV y poliomavirus BK, e infección fúngica invasiva [63, 108, 121, 122].

Así, Husain *et al* [121] hallaron que los valores de iATP eran significativamente inferiores en casos de infección por CMV en comparación con infecciones bacterianas en receptores de trasplante pulmonar (49,3 ng/ml vs 92 ng/ml); y que, para valores de iATP inferiores a 100 ng/ml, la *odds ratio* (OR) para el desarrollo de cualquier infección fue de 2,81, mientras que para el desarrollo de infecciones virales fue de 4,62.

Igualmente, en el estudio de Batal *et al* [63] en trasplantados renales, los valores medios de iATP fueron significativamente más bajos en pacientes con viremia por virus BK, en comparación con los de aquellos con viruria BK y los controles en los primeros seis meses tras el trasplante; además, en el grupo de pacientes con viruria, cifras más bajas de iATP se asociaron con cargas virales más elevadas de virus BK en orina. Todo esto sugiere que la actividad funcional de los linfocitos T CD4+ es relevante para el desarrollo de inmunidad frente a este virus y que, en consecuencia, el ensayo Immuknow® podría utilizarse para identificar pacientes con riesgo de desarrollar infección por virus BK. Del mismo modo, De Paolis *et al* [108] llegaron a conclusiones similares en relación con la infección por CMV, al observar que valores bajos de iATP pueden predecir la replicación viral de CMV hasta en un 60% de los casos.

En receptores de trasplante hepático Mendler *et al* [123] han observado valores de iATP significativamente inferiores en aquellos con infección por el virus de la hepatitis C (VHC) frente a los no infectados, con valores aún menores entre los infectados por VHC que desarrollan enfermedad recurrente sobre el injerto en comparación los que no lo hacen. En su estudio, sin embargo, no encontraron diferencias significativas en los valores de iATP en pacientes que presentaron infección bacteriana frente a los que permanecieron estables [123]. Puesto que en el control de la

infección por el VHC es fundamental una respuesta inmune fuerte mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> [124], el valor de iATP puede ser de utilidad a la hora de identificar a aquellos trasplantados hepáticos con mayor riesgo de desarrollar una infección más agresiva, como demostró el estudio de Alkohuri *et al* [125] en el que el riesgo progresión a fibrosis avanzada, fue mayor en aquellos pacientes con cifras menores de iATP; de hecho, por cada incremento en 25 ng/dl del valor de iATP en el cuarto mes post-trasplante, este riesgo disminuyó en un 22%.

En cuanto a la infección fúngica, en un estudio en 248 receptores de trasplante hepático se constató que aquellos que presentaban una infección fúngica invasiva (IFI) tenían un valor medio de iATP significativamente menor que los pacientes con infecciones bacterianas comunes y que un valor de iATP inferior a 100 ng/ml era un factor de riesgo independiente para el desarrollo de IFI (OR 3,44; p 0,002) [96]. Igualmente, otro estudio en trasplantados pulmonares observó que pacientes colonizados por hongos filamentosos tenían valores de iATP mayores que los que desarrollaban IFI y que la progresión a infección invasiva se observaba en aquellos trasplantados con valores de iATP inferiores a 50 ng/ml, lo que identificaría un subgrupo de pacientes que pudiera beneficiarse de una profilaxis antifúngica dirigida [121].

Todas estas limitaciones descritas en el diseño de los estudios, muchos de ellos con pequeño tamaño muestral y bajo número de eventos infecciosos, que en la mayoría de las ocasiones se analizan de forma global, han dificultado llegar a conclusiones definitivas a cerca de la utilidad de la medición de iATP en la predicción de infecciones.

**Tabla 5:** Estudios previos sobre la capacidad de la medición de la concentración de iATP en la predicción de infecciones en receptores de trasplante de órgano sólido en edad adulta.

Estudio autor, fecha [referencia]	Número y tipo de trasplante	Número de muestras de iATP y esquema de obtención de las mismas	Resultados	Conclusiones	Limitaciones
Kowalski R <i>et al</i> 2006 [102]	504 receptores de trasplante de órgano sólido (riñón, hígado, corazón e intestino delgado)	1833 mediciones de iATP, 75% en el primer año post-trasplante y 25% en los siguientes 2 años Recogen muestras durante periodos de estabilidad y en el momento de infección	Mediana iATP en momento de estabilidad vs momento de infección 249 ng/ml vs 111 ng/ml (p<0,001) iATP=25 ng/ml: 12 veces más riesgo de desarrollar infección que valores de iATP mayores objetivo para minimizar riesgo de infección y rechazo: iATP=280 ng/ml	La determinación de iATP tiene alto VPN Objetivo: mantener iATP en torno a 280 ng/ml para evitar infección y rechazo	No se especifica si se establecen los riesgos con las mediciones realizadas en momento de infección activa o en periodo de estabilidad valorando qué ocurre después Analizan todas las infecciones de forma global
Thai NL <i>et al</i> 2006 [115]	69 receptores de trasplante de páncreas (36 páncreas-riñón, 19 riñón previo)	299 mediciones de iATP a intervalos de 3 meses y en algunos casos en los periodos de infección	Media de iATP en 51 pacientes estables 194 ng/ml vs 38 ng/ml en 14 pacientes con infección (p<0,001) Pacientes con iATP < 100 ng/ml: riesgo de infección entre 4-7 veces mayor	La medición de iATP puede evaluar el exceso de tratamiento inmunosupresor e identificar pacientes susceptibles a infección	Miden valores de iATP en el momento de la infección Analizan todas las infecciones de forma global

Valero R <i>et al</i> 2006 [116]	89 receptores de trasplante renal	199 mediciones de iATP en pacientes ingresados a lo largo de 18 meses (no precisan esquema de monitorización)	Media de iATP en pacientes con infección significativamente menor que en pacientes estables (230 ng/ml vs 314 ng/ml, p=0,018)  Tasa de infección 50% en pacientes con respuesta inmune débil, 37,9% en caso de respuesta moderada y 15,4% si es fuerte  AUC-ROC para detectar infección 0,622	La medición de iATP puede ayudar a diferenciar qué pacientes tienen más riesgo de infección	Esquema de monitorización no precisado. Parece que determinan iATP en momento de infección activa  Analizan todas las infecciones de forma global
Cadillo-Chávez R <i>et al</i> 2006 [103]	59 receptores de trasplante renal	Mediciones pre- y post-trasplante de iATP (no precisan en qué momentos)	Pacientes con valores de iATP <224 ng/ml: 4,4 veces más riesgo de infección que pacientes con valores superiores  Infecciones graves en pacientes con iATP < 200 ng/ml	Medición de iATP puede ser útil en determinar el riesgo de infección	No precisan momentos de monitorización de iATP. Muestra pequeña, sólo 11 episodios de infección. Analizan todas las infecciones de forma global
Sánchez-Velasco P <i>et al</i> 2008 [97]	81 receptores de trasplante renal	Medición de iATP en la segunda semana post-trasplante en 29 pacientes y en el primer o segundo día de ingreso en otros 52 pacientes (no especifican el motivo de ingreso)	Media de iATP en pacientes con infección significativamente menor que en pacientes estables (197 ng/ml vs 313 ng/ml, p=0,008)  AUC-ROC para detectar infección 0,67  62,5% de los pacientes con infección respuesta inmune débil	Hallan diferencias significativas en los valores de iATP entre trasplantados estables e infectados	El momento para determinar iATP no es igual en todos los pacientes. Parece que determinan iATP en momento de infección activa. Analizan todas las infecciones de forma global

Bohrade SM <i>et al</i> 2008 [99]	57 receptores de trasplante pulmonar	143 muestras recogidas durante una visita rutinaria cuando el paciente recibía dosis de FK estables. Protocolo no bien definido, con algunas muestras recogidas durante episodios de infección activa	Pacientes con infección: iATP más bajo en el momento de la infección activa en comparación con pacientes estables (111 ng/ml vs 283 ng/ml, p<0,0001)  iATP<225ng/ml: S 93% E38% VPP47% VPN96% para predecir infección	Asociación entre concentraciones bajas de iATP e infección	Miden iATP en momento de infección  Analizan todas las infecciones de forma global
Gupta S <i>et al</i> 2008 [95]	111 receptores de trasplante cardiaco	182 muestras recogidas en la visita anual de seguimiento a pacientes trasplantados o en situaciones de inestabilidad clínica	No diferencias en la media de iATP entre los que desarrollan infección y los que no (267 ng/ml vs 282 ng/ml, p=0,7)  No diferencias en la media de iATP entre los que desarrollan infección por CMV y los que no (214 ng/ml vs 290 ng/ml, p=0,4)	La medición de iATP no es suficientemente S ni E para ser usada en la predicción de infección en pacientes trasplantados	Número de eventos muy escaso. Incluyen episodios que ocurren hasta 6 meses después de la determinación de iATP
Batal I <i>et al</i> 2008 [63]	170 receptores de trasplante renal	296 muestras recogidas entre 15 y 180 días post-trasplante  En casos de infección por virus BK sólo se incluyeron muestras dentro de los 14 días previos al episodio	Mediana de iATP significativamente distinta entre pacientes estables, pacientes con viremia por virus BK y pacientes con viremia por virus BK (228 ng/ml, 195 ng/ml y 87 ng/ml)	La medición seriada de la concentración de iATP se puede emplear para identificar pacientes con riesgo de desarrollar viremia por virus BK  La actividad funcional de los linfocitos TCD4 <sup>+</sup> es fundamental para desarrollar inmunidad frente al virus BK	Pequeño tamaño del estudio
Mendler M <i>et al</i> 2008 [123]	114 receptores de trasplante hepático	447 muestras de iATP solicitadas en el momento de disfunción hepática, coincidiendo con un evento (infección, trombosis de arteria hepática, obstrucción de la vía biliar) o en pacientes estables	Receptores con VHC+ valores de iATP inferiores a los de receptores VHC- iATP inferior en pacientes con recurrencia de enfermedad por VHC sobre el injerto frente a los que no la desarrollaron (141 vs. 182 ng/ml, p=0,01). Los valores de iATP fueron similares en pacientes con sepsis frente a estables	La respuesta inmune determinada a través de la medición de iATP aparece disminuida en receptores de trasplante hepático con recurrencia de enfermedad por VHC sobre el injerto	Se determinaron los valores de iATP en el momento del evento

Kobashigawa JA <i>et al</i> 2009 [101]	296 receptores de trasplante cardiaco	864 muestras recogidas durante las visitas de rutina en el primer año post-trasplante y después cada 6 meses tras el primer año. Registran eventos que ocurren dentro del primer mes tras la monitorización	Media de iATP entre los que desarrollan infección menor que en estables (187 vs. 280 ng/ml, $p<0,001$ ). 10% de episodios de infección en pacientes con iATP<200 ng/ml, vs 2% en pacientes con iATP>200 ng/ml, $p<0,001$ . iATP 200 ng/ml: S 71% y E 73% para predecir infección	Valores de iATP < 200 ng/ml pueden predecir riesgo de infección en pacientes trasplantados cardiacos	Modifican inmunosupresión en casos de valores extremos de iATP. Analizan todas las infecciones de forma global
Millán O <i>et al</i> 2009 [90]	84 receptores de trasplante de órgano sólido (50 renales y 34 hepáticos)	84 muestras de iATP recogidas durante las visitas de rutina Parece que las muestras se toman fuera del momento de infección activa	iATP significativamente menor en los trasplantados con infección frente a los estables (94 vs. 281 ng/ml)	Los valores de iATP pueden ayudar a prevenir infecciones en pacientes con un exceso de inmunosupresión y diferenciar pacientes estables de infectados	Sólo tres episodios de infección en los 84 receptores de trasplante. Analizan todas las infecciones de forma global
Pérez-Flores I <i>et al</i> 2009 [98]	38 receptores de trasplante renal	Medición de iATP varias veces en los primeros meses postrasplante (no se especifica esquema de monitorización). Parece que las muestras se toman fuera de momentos de infección	Pacientes con infecciones graves muestran valores de iATP más bajos que pacientes sin infección (180 vs. 416 ng/ml)  Infecciones más frecuentes con iATP<225 ng/ml	Relación entre número y gravedad de infecciones y niveles de iATP  Muy poco número de eventos. Analizan todas las infecciones de forma global	No se especifica el esquema de monitorización.
Husain S <i>et al</i> 2009 [121]	175 receptores de trasplante de pulmón	710 muestras recogidas durante visitas rutinarias, no programadas o durante ingreso hospitalario	Mediana de iATP en pacientes con infección vs estables: -CMV: 49,3 vs. 174,8 ng/ml, $p<0,0001$ . -Otras infecciones virales: 70,3 vs. 174,8 ng/ml $p<0,05$ -IFI: 85 vs 174,8 ng/ml $p<0,05$ -Neumonía bacteriana 92,4 vs. 174,8 ng/ml, $p=0,0019$ Valores de iATP <100 ng/ml se correlacionan con aumento de riesgo de infección con una OR 2,66 (multivariante)	Las distintas categorías mayores de síndromes infecciosos (bacteriano, viral y fúngico) se asocian con distintos grados de inmunoreactividad determinada a través de medición de iATP. El valor más bajo de iATP se observa en infecciones virales	Mediciones de iATP realizadas durante la infección

Israeli M <i>et al</i> 2010 [64]	50 receptores de trasplante cardiaco	327 muestras recogidas durante revisiones rutinarias de pacientes (no precisa) y en momento de inestabilidad	Media de iATP en el momento de infección frente al periodo estable (129 vs.351 ng/ml, p<0,05) Descenso de iATP entre momento estable previo y momento de infección	Los cambios de iATP entre momentos estables y de desestabilización clínica apuntan hacia el beneficio de monitorización seriada de iATP	Largos periodos entre un valor individual y un evento que ocurre meses después. Algunas de las mediciones de iATP se realizan en momento de infección. Analizan todas las infecciones de forma global
Xue F <i>et al</i> 2010 [100]	106 receptores de trasplante hepático	217 muestras, recogidas de forma programada en el post-trasplante o en el momento de una infección	Receptor de trasplante con valor de iATP<130 ng/ml: riesgo 12 veces mayor de desarrollar infección Valores bajos de iATP (no especifica valor exacto): S 85,2% y E 76,3% para el diagnóstico de infección	Los valores de iATP son útiles en monitorizar receptores de trasplante hepático con infección	Valores de iATP medidos en momento de infección. Analizan todas las infecciones de forma global
Helantera I <i>et al</i> 2010 [122]	27 receptores de trasplante renal	61 mediciones de iATP recogidas en el primer mes post-trasplante, tercero y sexto a criterio del médico. Registro de infecciones virales en los primeros 30 días tras la monitorización	La respuesta inmune medida a través de iATP fue menor en casos de viremia positiva por virus BK o por CMV en comparación con pacientes sin viremia (p=0,009 y p=0,017)  Ningún paciente presentó viremia cuando los valores de iATP eran > 380 ng/ml.	La viremia por CMV se asoció con un valor significativamente inferior de la respuesta inmune celular. La ocurrencia de infecciones por CMV podría reducirse evitando el exceso de inmunosupresión	Esquema de monitorización no definido y distinto para cada paciente. El clínico conocía el valor de iATP y podía modificar el tratamiento inmunosupresor en consecuencia



Huskey J <i>et al</i> 2011 [109]	583 trasplantados renales	1330 mediciones de iATP, recogidas de 3 modos: -en los meses 0,1,6 y 12 post- trasplante -en pacientes estables que llevaban trasplantados ≥2 años, sin seguir el esquema previo -con sospecha de infección Se correlacionaron los valores con el desarrollo posterior de un evento. Se utilizaron los valores de iATP medidos dentro de los 90 días previos a un evento	No diferencias estadísticas en la media de iATP entre los que desarrollaron infección oportunistas y no (386 vs 417 ng/ml, p=0,24)  Valores de iATP < 225 ng/ml no se asociaron con el desarrollo posterior de infección oportunista, con S 21%, E 83% y OR 1,34 (IC 95% 0,64-2,82)	La medición de iATP en un momento del post-trasplante renal no identifica los individuos en riesgo de desarrollar posteriormente episodios de infección oportunistas	Registran episodios de infección ocurridos hasta 90 días después de la determinación de iATP, lo que puede no reflejar el valor real de iATP previo a la infección. Algunas muestras extraídas en momento de infección. Analizan todas las infecciones de forma global
Gralla J <i>et al</i> 2011 [119]	414 receptores de trasplante renal	897 mediciones de iATP según un esquema preestablecido basal y en los meses 1, 6 y 12 post-trasplante	Valores de iATP ≤225 ng/ml en el mes 1 ó 6 no se asociaron con el diagnóstico de infección por virus BK en el mismo momento de la determinación de iATP. Un cambio >150 ng/ml en el valor de iATP entre los meses 1 y 6 no se asoció con infección por virus BK. Valores de iATP ≤ 225 ng/ml en el mes 12 se asociaron con infección por virus BK en ese momento	Los valores de iATP en el mes 12 post-trasplante sí parecen asociarse con más episodios de infección por virus BK por lo que la medición de iATP podría reflejar un exceso de inmunosupresión y el paciente beneficiarse de una monitorización más estrecha y ajuste del tratamiento inmunosupresor en este periodo	Miden el iATP y la viremia y viremia por virus BK en el mismo momento
De Paolis P <i>et al</i> 2011 [108]	49 receptores de trasplante renal	Mediciones regladas de iATP: basal, 7, 14, 21, 42 días y 3,6 y 12 meses post-trasplante. Un total de 390 muestras	Valores de iATP <225 ng/ml fueron capaces de predecir la replicación de CMV en 12 de 21 pacientes con viremia positiva (57,1%)	La medición de iATP permite para predecir la presencia de viremia o enfermedad por CMV	No precisa en qué momento se extraen las muestras para CMV y si coinciden con la medición de iATP



Zhou T <i>et al</i> 2011 [96]	248 receptores de trasplante hepático	456 mediciones de iATP solicitadas ante sospecha clínica de infección o alteración del perfil hepático	Media de iATP en pacientes con IFI 109 ng/ml vs. 174 ng/ml en casos de infección bacteriana (p 0,01)  ATP <100 ng/ml factor de riesgo independiente para desarrollo de IFI (OR 3,44, p=0,002)	La medición de iATP puede identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar IFI tras el trasplante hepático. Debería valorarse la administración de profilaxis en estos pacientes	Estudio retrospectivo Valores de iATP medidos en el momento de infección. No comparan iATP en IFI con iATP en infecciones virales
Zhou H <i>et al</i> 2011 [104]	259 receptores de trasplante renal	Mediciones de iATP recogidas antes y después del trasplante. No esquema de monitorización preciso. Recogen los eventos ocurridos siete días antes o después de la medición. Consideran estables a pacientes que no presentan evento en ese periodo	Media de iATP en pacientes que desarrollan infección significativamente inferior a la de pacientes estables (116 vs. 347 ng/ml, p<0,05 )  AUC-ROC para el diagnóstico de infección 0,991 (p<0,001). iATP 238 ng/ml: S 92,9% y E 100% para el diagnóstico de infección	La medición de iATP tras el trasplante es de utilidad para monitorizar la respuesta inmune y predecir la ocurrencia de infecciones con valores de iATP <238 ng/mL con una sensibilidad y especificidad elevadas	No precisan el momento de recogida de las muestras de iATP tras el trasplante. Algunas mediciones se realizan tras el evento infeccioso. Analizan todas las infecciones de forma global
He J <i>et al</i> 2013 [105]	42 receptores de trasplante renal	193 mediciones de iATP: - inmediatamente antes del trasplante; semanal el primer mes; mensual los primeros seis meses; y después en el mes 12, 24 y 30 post-trasplante -pacientes libres de evento en revisiones de rutina -sospecha clínica de infección	Los valores medios de iATP son significativamente menores cuando los pacientes son diagnosticados de una infección en comparación con valores en momento libre de evento (130,1 vs.279,9 ng/ml, p<0,01)	La medición de iATP puede ser empelada para identificar aquellos trasplantados renales con mayor riesgo de infección	Parece que los valores de iATP en los casos de infección son los medidos en el momento de la infección y no los previos obtenidos según el protocolo. Analizan las infecciones globalmente
Libri I <i>et al</i> 2013 [118]	55 receptores de trasplante renal (dos de ellos páncreas-riñón)	Mediciones de iATP inmediatamente antes de cirugía, meses 1, 2, 3, 6, 9 y 12 post-trasplante, cada 6 meses hasta el mes +36	iATP ≤225 ng/ml: S 63,2%; E 5,7%; OR 0,10 (IC 95%: 0-0,52) para el diagnóstico de infección por CMV, virus BK o VHS. AUC-ROC: 0,34	La medición de iATP no es útil en la predicción de eventos infecciosos	Muestra de pequeño tamaño y pocos eventos clínicos

Quaglia M <i>et al</i> 2014 [126]	118 receptores de trasplante renal	272 mediciones de iATP en el mes 1, 3 y 6 post-trasplante	La caída de valores de iATP > 30 ng/ml entre el mes 1 y 3 post-trasplante supone un riesgo del 31,8% de tener viremia CMV positiva en mes 3, comparando con 8,3% si los valores de iATP son estables o en ascenso (OR 5,13; IC 95%: 1.06-24.93, p=0,043) No asociación entre valores puntuales de iATP y viremia	La caída en los valores de iATP en los primeros meses post-trasplante puede predecir el desarrollo de infecciones virales oportunistas	Se determinan a la vez el iATP y la viremia de CMV
--------------------------------------	--	--	--	---	--

S: sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, OR: *odds ratio*, AUC-ROC: área bajo la curva ROC, IFI: infección fúngica invasiva, FK: tacrolimus, CMV: citomegalovirus.

c) *Concentración de iATP en la predicción de mortalidad*

Si bien la mayoría de estudios se han centrado en la capacidad del ensayo Immuknow® para predecir la aparición de rechazo o infección tras el trasplante de órgano sólido, algunos autores han observado que el riesgo de mortalidad es mayor en pacientes con valores extremadamente bajos de iATP. Así, por un lado, Berglund *et al* [127] mostraron que la mortalidad a corto plazo era tres veces mayor en pacientes con valores de iATP menores de 175 ng/ml (14,4% vs 5.2% para valores mayores de 175 ng/ml,  $p < 0,005$ ) y, por otro, Britz *et al* encontraron esta asociación ante valores de iATP inferiores a 100 ng/ml. [128]. Este incremento de la mortalidad en este grupo de pacientes derivaría de la mayor incidencia de infección y malignidad propiciada por una sobreinmunosupresión.

En un ensayo clínico reciente, Ravaioli *et al* [129] hallaron que la supervivencia al año fue significativamente mayor en aquellos receptores de trasplante hepático en los que se determinaron de forma seriada los valores de iATP y se ajustó la dosis de fármacos inmunosupresores en función de los mismos, con reducción de las dosis un 25% cuando los valores de iATP eran inferiores a 130 ng/ml, y aumento en un 25% si eran superiores a 450 ng/ml. La supervivencia al año de este grupo de pacientes fue del 95%, en comparación con un 82% en receptores de trasplante hepático atendidos de la forma habitual sin monitorización de iATP ( $p < 0,01$ ). Además, observaron que los pacientes en el grupo de intervención presentaron menor incidencia de infecciones.

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

## 2. Justificación del estudio

La monitorización funcional basada en la medición de iATP en células T CD4<sup>+</sup> estimuladas permitiría un tratamiento inmunosupresor dirigido para cada paciente en función de su respuesta inmune, en lugar de un ajuste empírico de las dosis de fármacos inmunosupresores [113]. Sin embargo, la aplicación óptima de este ensayo en la práctica clínica está aún por definir.

El trabajo propuesto pretende solventar las limitaciones observadas en estudios previos, a través de una monitorización dinámica de la inmunidad celular en receptores de trasplante renal según un protocolo establecido, que evalúe en cada momento el estado neto de inmunosupresión del paciente y su riesgo individual de presentar un tipo concreto de complicación infecciosa post-trasplante.

Desde el punto de vista clínico se abriría la posibilidad de elaborar estrategias específicas de profilaxis y tratamiento precoz (antibiótico, antifúngico o antiviral), ajustado al riesgo basal del receptor de presentar algún evento infeccioso durante su evolución post-trasplante en función de los valores de iATP. Igualmente, podría sentar las bases para el diseño de pautas individualizadas de tratamiento inmunosupresor en las que el riesgo de infección pudiera evaluarse de forma conjunta con el de rechazo del injerto.

Esta estrategia contaría con la ventaja de estar fundamentada en un ensayo comercial (ImmuKnow®) validado, reproducible y técnicamente sencillo, circunstancia que favorecería su aplicación en la práctica clínica.

### **3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO**

### **3. Hipótesis del estudio**

La monitorización periódica de la respuesta inmune celular en receptores de trasplante renal, determinada a través de la medición repetida según un esquema preestablecido de la concentración de iATP producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, puede predecir la aparición de episodios de infecciosos en el periodo post-trasplante.

## **4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO**



## **4. Objetivos del estudio**

### **4.1 Objetivo primario**

- Evaluar la utilidad de una monitorización estructurada (según un esquema preestablecido y no ante el desarrollo de un evento clínico) de la inmunidad celular en receptores de trasplante renal mediante la medición del iATP producido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina, para predecir con ello el riesgo individual de presentar una complicación infecciosa tras el trasplante renal.

### **4.2 Objetivos secundarios**

- Analizar la capacidad del ensayo para predecir el riesgo de infección por determinados microorganismos en los que la actividad funcional de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es más relevante para el desarrollo de inmunidad frente a ellos, fundamentalmente infecciones víricas.
- Evaluar la utilidad de una monitorización estructurada de la inmunidad celular en receptores de trasplante renal mediante la medición de iATP producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, con el fin de predecir el riesgo de desarrollar un episodio de rechazo tras el trasplante, y con ello validar un método que permita un ajuste individualizado del tratamiento inmunosupresor sin incrementar la incidencia de rechazo.
- Analizar la influencia que ejercen diversas variables sobre la dinámica de la inmunidad mediada por células tras el trasplante: estado inmune basal, tipo de tratamiento de inducción, rechazo agudo del injerto e infecciones.

## **5. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

## **5. Pacientes, material y métodos**

### **5.1 Lugar de realización del estudio**

El presente estudio se ha realizado en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, adscrito a la Universidad Complutense. Se trata de un hospital general de tercer nivel con aproximadamente 1.000 camas, que atiende a una población de referencia en torno a 450.000 habitantes.

Desde el año 1976 se desarrolla en este Centro un programa de trasplante de órgano sólido con realización de más de 2.200 trasplantes desde entonces. El trasplante renal ocupa el primer puesto en cuanto a número, con unos 150 anuales, lo que convierte a este Hospital en uno de los centros con más experiencia en este campo. Concretamente, en 2013 se realizaron en él 141 trasplantes renales [130].

### **5.2 Diseño del estudio**

Estudio observacional, prospectivo, longitudinal de una cohorte de receptores de trasplante renal (TR).

### **5.3 Pacientes y periodo del estudio**

Se reclutaron pacientes sometidos de forma consecutiva a un trasplante renal en el Hospital Universitario 12 de Octubre. Según el ritmo de realización de este trasplante en dicho centro, asumiendo una incidencia aproximada de infección total en el primer año post-trasplante del 65% [25] y buscando un equilibrio entre un tamaño de la muestra suficiente para alcanzar un número significativo de eventos y un número de pacientes razonable para poder controlar la cohorte por el investigador en los meses de seguimiento, el tamaño muestral previsto fue de 75-100 pacientes, con inclusión final de 103 pacientes. El periodo de reclutamiento comenzó el 1 de diciembre de 2011

y finalizó el 15 de marzo de 2013, con un seguimiento mínimo de un año tras el trasplante, o hasta el fallecimiento del paciente o la pérdida del injerto en caso de que esto ocurriera más precozmente.

Los criterios de inclusión para el reclutamiento fueron:

- Paciente sometido a trasplante renal atendido en nuestro Centro y en el que se pudiera realizar un seguimiento adecuado de las variables a estudio a lo largo del primer año post-trasplante.
- Mayor de 18 años.
- Que concediera por escrito su consentimiento para participar en el estudio

Se establecieron como criterios de exclusión:

- Receptores de trasplante páncreas-riñón.
- Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> inferior a 500/mm<sup>3</sup> u otra inmunodeficiencia primaria conocida previa al trasplante (ej. Inmunodeficiencia común variable).
- Fallecimiento en la primera semana tras el trasplante.
- Pérdida del injerto con explante del órgano y/o retirada de la inmunosupresión en la primera semana tras el trasplante.
- Trasplantes realizados durante el fin de semana por criterios logísticos en cuanto a la determinación del iATP en las primeras 24 horas tras la extracción de la muestra.

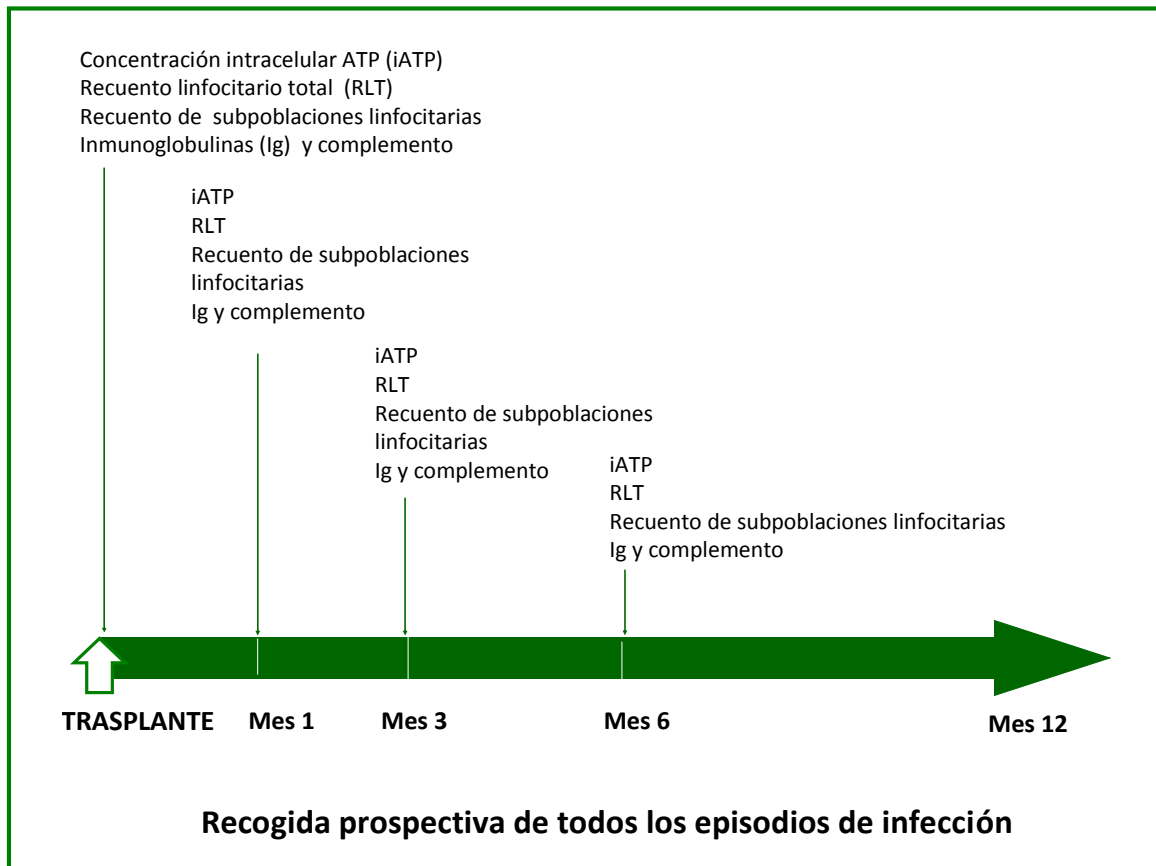
#### **5.4 Cronología del estudio. Visitas y seguimiento**

Tras la inclusión de cada paciente en el estudio, se realizó su seguimiento mediante visitas programadas en las Consultas de trasplante renal: quincenalmente durante el primer trimestre tras el trasplante, mensualmente entre el cuarto y el duodécimo mes post-trasplante y posteriormente de forma bimensual entre los 12 y 18 meses. En cada visita se realizó anamnesis y examen físico de todos los pacientes. Todos los episodios de infección (tanto los que requirieron ingreso hospitalario como los tratados de forma

ambulatoria) fueron recogidos por un experto en enfermedades infecciosas que desconocía el estado inmunológico del paciente.

A cada paciente incluido en el estudio se le extrajeron muestras de sangre para determinación de creatinina, hemoglobina, recuento de leucocitos totales, recuento linfocitario y de subpoblaciones linfocitarias, cuantificación de inmunoglobulinas y Complemento y determinación de la concentración iATP inmediatamente antes del trasplante (basal) y posteriormente según un esquema predeterminado (figura 8), al primer, tercer y sexto mes tras la realización del trasplante.

**Figura 8:** Cronograma del estudio.

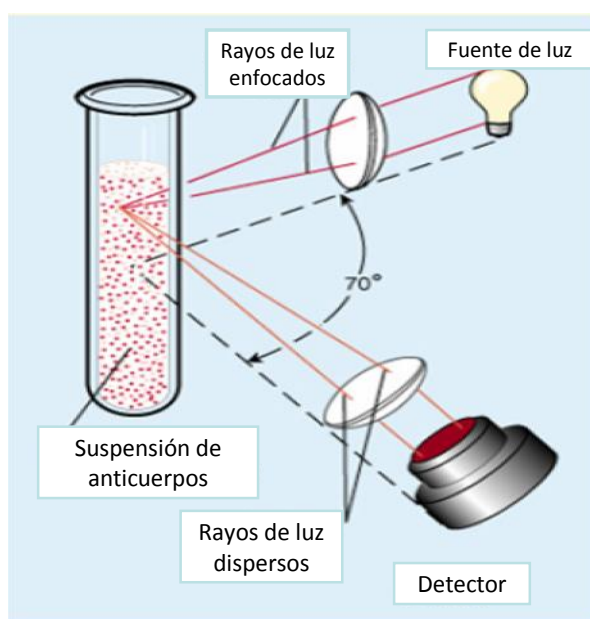


### 5.5 Procedimientos del estudio: pruebas inmunológicas

La determinación de linfocitos totales y de subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante citometría de flujo en sangre completa (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, EEUU). La cuantificación fue llevada a cabo en un citómetro de flujo FACS Canto II Flow Cytometer, utilizando el software de adquisición FACS Canto Clinical software (BD Biosciences, San José, CA, EEUU) inmediatamente después de la tinción celular. Los anticuerpos monoclonales empleados para el análisis de las subpoblaciones linfocitarias fueron conjugados con fluoresceína-isotiocianato (anti-CD3), ficoeritrina (anti-CD8, anti-CD16 y anti-CD56), proteína peridín clorofila (anti-CD45), y alofococianina (anti-CD19 y anti-CD4) [131].

Las concentraciones de inmunoglobulinas séricas fueron cuantificadas por nefelometría (Image-system Beckman Coulter GMBH, Krefeld, Alemania), un procedimiento analítico que permite determinar la concentración de partículas en suspensión en un líquido en función de la dispersión de la luz que atraviesa dicha solución (figura 9) [132]. Los rangos de normalidad en nuestro laboratorio fueron: IgG 700-1600 mg/ml, IgA 70-400 mg/dl e IgM 40-230 mg/dl.

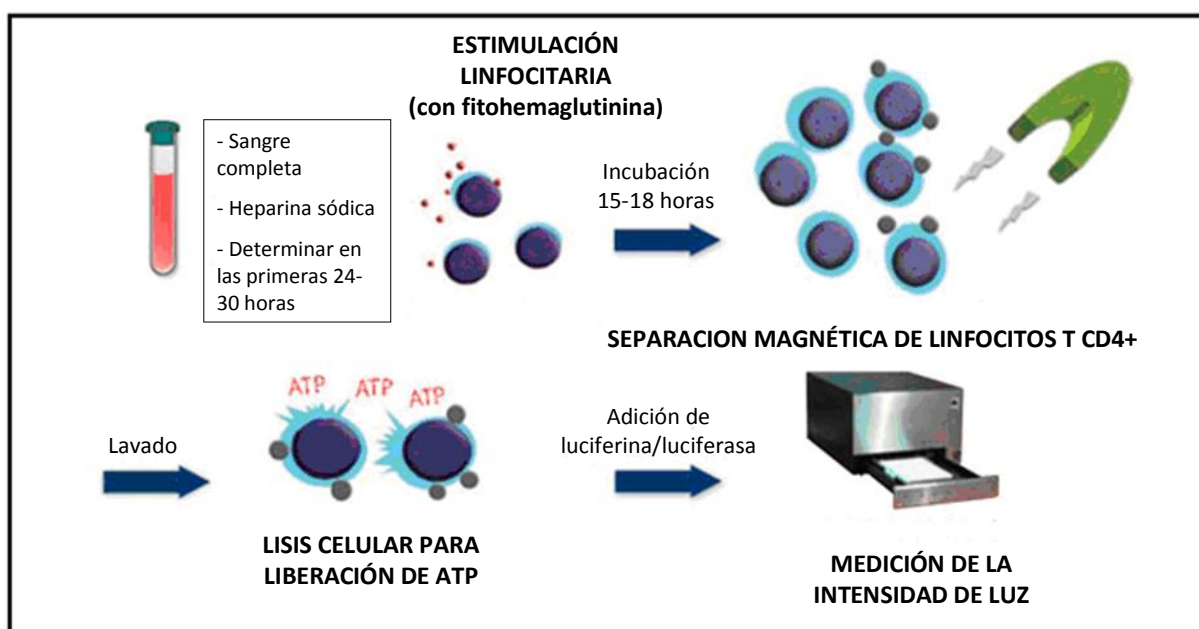
**Figura 9:** Técnica de nefelometría.



Los valores séricos del Complemento fueron cuantificados también por nefelometría (Image 800, Beckman Coulter, Villepinte, Francia). Los rangos normales en nuestro laboratorio fueron: entre 83 y 171 mg/dl para C3 y entre 14 y 38 mg/dl para C4.

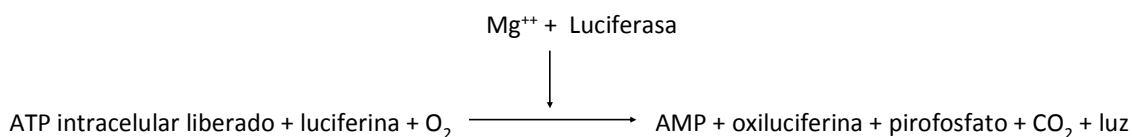
La determinación de la concentración intracelular de ATP se realizó mediante el ensayo comercial Immuknow® [91] (figura 10).

**Figura 10:** Esquema del protocolo del ensayo Immuknow® (Modificado de Cylex™/Viracor-IBT laboratorios).



En primer lugar, se toman 250 µl de sangre completa anticoagulada (EDTA) que se diluyen en un diluyente de muestras, suministrado por la casa comercial, en proporción 1:4. A continuación, 100 µl de esa dilución se incuban en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C durante 15-18 horas con fitohemaglutinina (2,5 µg/ml), o sin ella en el caso de los controles negativos. Posteriormente se seleccionan las células TCD4<sup>+</sup> utilizando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales antiCD4<sup>+</sup> humanos, que son separadas del resto de células mediante un imán. El lavado posterior elimina aquellas células que no se han adherido al imán. Tras dicho lavado se

añade un agente con capacidad para lisar las células (reactivo de lisis proporcionado por la casa comercial), de modo que se libera el iATP. El iATP liberado se cuantifica mediante un método quimioluminescente al añadir una mezcla luciferina/luciferasa al lisado celular, según la siguiente reacción:



Treinta minutos después de la adición de la luciferasa el producto luminescente se mide en un luminómetro (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, EEUU). La cantidad de luz emitida (emisión máxima 562 nm) es proporcional a la concentración de ATP. Dicha concentración (ng/ml) se calcula a partir de una curva de calibración y se compara con los valores de ATP patrón para caracterizar la función inmune celular de la muestra. Todo esto queda resumido en el anexo 1.

## 5.6 Inmunosupresión y regímenes de profilaxis

### 5.6.1 Inmunosupresión

#### *a) Tratamiento de inducción*

El tratamiento de inducción con globulina antitimocítica o basiliximab fue empleado en los casos mencionados a continuación:

#### - Globulina antitimocítica (ATG)

Para minimizar el riesgo de nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina (CNI) todos los receptores de órganos de donantes en asistolia recibieron inducción con globulina antitimocítica (Fresenius ATG 1 mg/Kg/día durante 5-7 días) con introducción tardía del CNI a partir del día +6 tras el trasplante.



También recibieron inducción con ATG durante los días 1-3 días con inicio precoz de CNI desde el día 0: a) los receptores con alto grado de riesgo inmunológico con un panel reactivo de anticuerpos mayor del 50%, b) los casos de un segundo trasplante renal si el anterior se perdió por rechazo en los dos años previos al nuevo trasplante, y c) los receptores de un tercer o cuarto trasplante renal.

- Basiliximab

El basiliximab (Simulect®) fue empleado para la inducción en pacientes con alto riesgo de nefrotoxicidad por CNI por edad avanzada o comorbilidades pretrasplante con introducción retrasada de CNI a partir del quinto día post-trasplante, a dosis de 20 mg los días 0 y 4 post-trasplante.

Se añadió rituximab al tratamiento de inducción con ATG o basiliximab en pacientes hiperinmunizados con anticuerpos anti HLA específicos de donante o como prevención de recidiva de glomérulo-esclerosis segmentaria y focal.

*b) Tratamiento de mantenimiento*

El tratamiento de mantenimiento consistió en tacrolimus a dosis de 0,1 mg/Kg/día ajustado para concentraciones plasmáticas de 10-15 ng/ml durante el primer mes y de 5-10 ng/mL posteriormente; micofenolato de mofetil 1.000 mg dos veces al día o ácido micofenólico 360 mg dos veces al día; y prednisona a dosis de 1 mg/Kg/día con disminución progresiva de la dosis.

Se utilizó azatioprina (1-4 mg/Kg/día) en lugar de MFM en los casos de menor riesgo inmunológico. Se realizó conversión de MFM a mTOR (everolimus) con reducción simultánea de la dosis de inhibidores de la calcineurina (CNI) en casos de nefrotoxicidad por éstos, para mantener concentraciones plasmáticas de 5 ng/ml tanto de CNI como de everolimus

[133]. Asimismo, se realizó conversión a mTOR en pacientes con viremia de VEB persistente.

#### 5.6.2 Regímenes de profilaxis

Todos los pacientes recibieron una dosis única de cefazolina intravenosa prequirúrgica como profilaxis de infecciones bacterianas en relación con el procedimiento quirúrgico. La profilaxis para neumonía por *Pneumocystis jirovecii* fue administrada durante los primeros 12 meses tras el trasplante con trimetoprim/sulfametoxazol a dosis de 160/800 mg tres veces por semana. Los pacientes con alto riesgo de desarrollar enfermedad por CMV (donante con serología positiva para CMV y receptor con serología negativa-*missmatch*- o pacientes con inducción con ATG) recibieron profilaxis universal con ganciclovir intravenoso a dosis 5 mg/Kg/día o con valganciclovir oral (900 mg/día) durante 3-6 meses. No se realizó de forma rutinaria monitorización de viremia asintomática con vistas a un tratamiento anticipado en los seropositivos para CMV antes del trasplante.

### 5.7 Variables recogidas. Definiciones

#### 5.7.1 Características del receptor

- Características demográficas: edad y sexo
- Enfermedades previas: diabetes *mellitus* pretrasplante, cardiopatía, enfermedad pulmonar, hepatopatía, enfermedad arterial periférica, enfermedad tuberculosa.
- Serologías virales previas al trasplante
  - CMV: se definió serología positiva como la presencia de anticuerpos IgG frente a CMV en suero del receptor, determinados mediante un método de quimioluminiscencia (LIAISON® DiaSorin S.A, Saluggia, Italia),
  - Virus de la hepatitis C (VHC): se definió serología positiva como la presencia de anticuerpos frente a VHC en el suero. Dicha detección se

realizó mediante inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) en suero (ARCHITECT Abbot, Weisbaden, Alemania)

- Virus de la hepatitis B (VHB): se determinó la presencia de antígeno de superficie del VHB (HBsAg) medido mediante CMIA en suero (ARCHITECT Abbot, Sligo, Irlanda); presencia de anticuerpos IgG frente al HBsAg (HBsAC) medidos también mediante CMIA en suero (ARCHITECT Abbot, Weisbaden, Alemania); y anticuerpos IgG frente al antígeno del *core* del VHB (HBcAC) medido mediante un test de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (ETI-AB-COREK PLUS DiaSorin S.A., Saluggia, Italia). Se definió hepatitis B activa como la presencia de HBsAg, hepatitis B pasada como el hallazgo de HBcAC con negatividad de HBsAg, e inmunidad vacunal frente al VHB en caso de presencia aislada de HBsAC.
- Intradermorreacción de Mantoux previo al trasplante: realizado mediante la inyección intradérmica de 0,1 ml de un derivado purificado de antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. Se consideró positiva una induración igual o mayor a 5 mm de diámetro.
- Etiología de la enfermedad renal subyacente.
- Necesidad de tratamiento sustitutivo de la función renal antes del trasplante (hemodiálisis o diálisis peritoneal) y fecha de inicio de tratamiento renal sustitutivo.
- Trasplante previo: tipo y número de trasplantes.
- Inmunosupresión previa al trasplante y tipo de inmunosupresión.

#### 5.7.2 Características del donante

- Características demográficas: edad y sexo.
- Estado del donante: cadáver (muerte encefálica), asistolia (corazón parado) o vivo.
- Causa de la muerte en el caso de donante fallecido.
- Serología de CMV: se definió serología positiva como la presencia en el suero del donante de anticuerpos IgG frente a CMV, determinados

mediante un método de quimioluminiscencia (LIAISON® DiaSorin S.A, Saluggia, Italia).

### 5.7.3 Variables pretrasplante

- Compatibilidad HLA: se evaluó mediante el número de incompatibilidades que hubo entre el donante y el receptor en relación con el HLA. Se determinaron HLA DR, B y A mediante técnica de microlinfocitotoxicidad (One Lambda, Canogo Park, CA, EEUU). Cada uno de los *loci* del gen HLA tiene dos alelos, por lo que podía haber un total de 6 incompatibilidades entre donante y receptor.
- Serología de CMV del donante y receptor: ambas positivas (D+/R+); ambas negativas o doble negativo (D-/R-); donante negativo y receptor positivo (D-/R+); y donante positivo y receptor negativo o *missmatch* (D+/R-).
- Determinaciones analíticas en el receptor en el momento previo al trasplante (basales): hemoglobina (Hb), leucocitos totales, neutrófilos absolutos, linfocitos absolutos, subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8, CD19, células *natural killer*-NK), inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), Complemento (C3 y C4), concentración intracelular de ATP en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (iATP), creatinina, perfil férrico (hierro, ferritina, transferrina y saturación de transferrina).

### 5.7.4 Variables intraoperatorias y perioperatorias

- Tiempo de isquemia fría: tiempo transcurrido desde la implantación del injerto hasta la reperusión del órgano, medido en horas.
- Requerimientos transfusionales durante la intervención quirúrgica (número de concentrados de hematíes, pools de plaquetas y bolsas de plasma).
- Función retrasada del injerto: definida como la necesidad de diálisis en la primera semana tras el trasplante.
- Necesidad de reingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) durante el primer mes post-trasplante, necesidad de nueva intubación orotraqueal, tiempo de estancia en UCI en el caso de tener que reingresar.

### 5.7.5 Variables post-trasplante

- Tratamiento inmunosupresor (véase punto 5.6.1):
  - Tratamiento de inducción: si se recibió o no y el fármaco empleado (timoglobulina o basiliximab). Además, se registró la administración de rituximab en la inducción (excluyéndose los casos en los que se administró exclusivamente como tratamiento de rechazo).
  - Tratamiento de mantenimiento: inmunosupresión recibida por el paciente al alta, al tercer y al sexto mes. Se registró la realización de cambios en las pautas de inmunosupresión durante el seguimiento.
- Profilaxis antiinfecciosa para *P.jirovecii* y CMV (véase punto 5.6.2) en el momento del alta, al primer, al tercer y al sexto mes. De esta forma se determinó la duración de las pautas de profilaxis.
- Determinaciones analíticas en el receptor al mes, tercer mes y sexto mes post-trasplante: hemoglobina (Hb), leucocitos totales, neutrófilos absolutos, linfocitos absolutos, subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8, CD19, células *natural killer*-NK), inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA), Complemento (C3 y C4), concentración intracelular de ATP en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (iATP), creatinina, perfil férrico (hierro, ferritina, transferrina y saturación de transferrina).
- Complicaciones infecciosas [134]: definidas por el aislamiento de un microorganismo relevante (bacteria, virus, hongo o parásito) en una localización habitualmente estéril o bien en cualquier localización siempre que se acompañase de manifestaciones clínicas compatibles. También se consideraron como complicaciones infecciosas las sospechas clínicas sin aislamiento microbiológico pero con respuesta al tratamiento antimicrobiano empírico. A continuación se definen algunas de las complicaciones infecciosas observadas:
  - Bacteriemia: se definió como el aislamiento de bacterias en un set de hemocultivos. La bacteriemia por estafilococos coagulasa negativos (SCN), *Bacillus* o difteroides propios de la flora de la piel requirió, para ser considerada como tal, el aislamiento de dichas bacterias en al menos dos sets de hemocultivos junto con fiebre, escalofríos o

hipotensión. Se distinguió entre las bacteriemias primarias sin otro foco infeccioso y las bacteriemias asociadas a infección de catéter (central o periférico). Las bacteriemias secundarias a otro foco infeccioso no se consideraron en este grupo sino en función del foco primario.

- Cistitis aguda: definida como bacteriuria ( $>10^5$  UFC/ml de un microorganismo en el cultivo de orina espontánea) y síndrome miccional (disuria, polaquiuria, urgencia miccional). Se excluyó del análisis la bacteriuria y la candiduria asintomáticas.
- Pielonefritis aguda: definida como bacteriuria, fiebre  $> 37,8^{\circ}\text{C}$  y al menos uno de los siguientes síntomas: dolor lumbar, dolor a nivel del injerto, escalofríos, criterios de cistitis aguda.
- Infecciones de la herida quirúrgica: infecciones ocurridas en los 30 primeros días tras la cirugía que afectaban a la piel, tejido celular subcutáneo o tejidos blandos profundos en el mismo sitio de la herida quirúrgica con aislamiento del mismo microorganismo en al menos dos cultivos obtenidos de forma aséptica, preferiblemente mediante aspiración con jeringa y no con torunda.
- Neumonía: definida por la presencia de tos con esputo purulento o cambios en las características del mismo, dolor torácico pleurítico e infiltrado pulmonar, consolidación o cavitación en la radiografía de tórax. No se consideró imprescindible el aislamiento microbiológico para el diagnóstico, aunque sí que el clínico responsable hubiera hecho tal diagnóstico y decidido iniciar tratamiento antibiótico para ese proceso.
- Infección de vías respiratorias bajas: definida por la presencia de tos con esputo purulento o cambios en las características del mismo, sin alteraciones en la radiografía de tórax. No se consideró imprescindible el aislamiento microbiológico para el diagnóstico, aunque sí que se hubiera decidido iniciar tratamiento antibiótico para ese proceso por parte del clínico responsable del paciente. En los casos en los que se sospechó infección respiratoria de etiología viral se recogió un exudado nasofaríngeo con torunda en medio para transporte de muestras para

cultivo de virus (ViralPack® de Biomedics®) con realización sobre la muestra de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple mediante un ensayo comercial (Hexaplex® Prodesse, Wisconsin, EEUU) capaz de detectar la presencia de los siguientes virus: virus de la Gripe tipo A y B, Virus Respiratorio Sincitial (VRS) tipo A y B, virus Parainfluenza tipos 1, 2 y 3.

- Infecciones oportunistas: aquellas en las que la inmunidad mediada por células juega un papel fundamental para su control. Se deben a bacterias intracelulares (micobacterias, *Nocardia*, *Legionella*, *Listeria*), virus del grupo herpes (virus herpes simple –VHS-, virus varicela zoster –VVZ-, CMV, VEB), poliomavirus (virus BK), *P. jirovecii*, hongos filamentosos y levaduriformes, y parásitos (*Toxoplasma*, *Leishmania*). Se diagnosticó la tuberculosis mediante el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo o la identificación de su DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una muestra clínica representativa, también se aceptó el diagnóstico en los casos en los que la tuberculosis se demostró histopatológicamente [135]. La infección fúngica invasiva se diagnosticó de acuerdo a los criterios propuestos por la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer y el Grupo de Estudio de Micosis (EORTC/MSG); en el análisis sólo se incluyeron en el análisis casos probados o probables [136].
- Infección por CMV: se definió *enfermedad por CMV* como el aislamiento del virus CMV en cultivo de tejido o una antigenemia *pp65* de CMV positiva en presencia de síntomas sugerentes de síndrome viral (temperatura mayor de 37,8°C y uno de los siguientes hallazgos: leucocitos <4000 células/mm<sup>3</sup>, más de 3% de linfocitos atípicos en sangre periférica, plaquetas por debajo de 100.000/mm<sup>3</sup>, elevación de AST o ALT dos veces por encima del valor superior de normalidad) o de afectación orgánica por CMV (hepatitis, neumonitis, afectación gastrointestinal). Se definió como *infección por CMV* la presencia aislada de una antigenemia *pp65* de CMV positiva. La antigenemia positiva se clasificó en seis grupos, de acuerdo al número de leucocitos infectados

(aquellos leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica que presentaban la proteína *pp65* de CMV, detectada mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína) por cada 200.000 leucocitos contados: <10 por cada 200.000 leucocitos, 10-50, 50-100, 100-150, 150-200 y >200 [137, 138].

- Rechazo agudo: definido según criterios histológicos habituales. En ausencia de confirmación histológica se aceptó como diagnóstico de probabilidad la existencia de un deterioro agudo de la función renal con normalización tras el aumento del tratamiento inmunosupresor (administración de bolos de esteroides o de globulina anti-timocítica) [139]. Se registró el tipo de rechazo, la fecha del mismo y el tratamiento recibido, así como el número de episodios de rechazo por cada paciente.
- Otras complicaciones: desarrollo de diabetes *mellitus de novo* post-trasplante, estenosis de la arteria renal, necesidad de reintervención post-trasplante.
- Pérdida del injerto: definida como retorno a hemodiálisis. Se recogió además la necesidad o no de retirada del injerto y la realización de un retrasplante.
- Mortalidad de causa infecciosa y mortalidad por todas las causas.

## 5.8 Consentimiento informado y comunicación del estudio

Se solicitó el consentimiento informado a todos los pacientes que participaron en el estudio (en el anexo 2 se muestra una copia del documento proporcionado). La realización del estudio fue comunicada a la Unidad de Trasplante Renal y al Servicio de Inmunología. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital 12 de Octubre, que lo encontró “conforme a los principios de la investigación clínica en humanos a fecha 10 de mayo de 2011” (el anexo 3 muestra el informe del Comité de Ética y Ensayos clínicos).



## 5.9 Análisis estadístico

Las variables cualitativas se expresaron como frecuencias y porcentajes. Las variables cualitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central (medias o medianas) acompañadas de la medida de dispersión correspondiente (desviación estándar o rango intercuartílico, respectivamente).

Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de  $\chi^2$ , excepto en los casos en los que la frecuencia esperada fuera menor de 5 en más del 20% de las casillas, donde se aplicó la prueba exacta de Fisher. Las variables cualitativas continuas se compararon con la prueba t de Student en el caso de presentar una distribución normal, o con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney en caso de no presentarla. La normalidad de la distribución se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la igualdad de varianzas mediante la prueba de Levène.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para demostrar la asociación lineal entre variables cualitativas continuas con distribución normal. Se empleó el análisis ANOVA de medidas repetidas para evaluar las variaciones de iATP a lo largo del tiempo en cada grupo de sujetos.

El valor predictivo de las concentraciones de iATP se estudió mediante dos aproximaciones diferentes:

- Por un lado, las concentraciones de iATP medidas en diferentes puntos (en el momento del trasplante y en los meses 1, 3 y 6 post-trasplante) se categorizaron en tres grupos distintos de acuerdo a los puntos de corte establecidos en la literatura [94], en función del grado de respuesta inmune: débil ( $\leq 225$  ng/ml), moderada (225-525 ng/ml) y fuerte ( $\geq 525$  ng/mL). Se utilizó el test de tendencias de Mantel-Haenszel para valorar la existencia de gradiente en la distribución de eventos en función del grado de respuesta inmune. Las curvas de supervivencia libres de infección durante los periodos subsecuentes se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre grupos se compararon con la prueba de Log-Rank. Se emplearon los modelos de regresión de Cox univariante y

multivariante (mediante la selección condicional “hacia atrás” o *backward*) para evaluar la asociación entre los valores de iATP y los objetivos del estudio, con los resultados expresados como *hazard ratio* (HR) con intervalos de confianza al 95%.

- Se realizó otro tipo de análisis en el que las concentraciones de iATP se consideraron como una variable continua y se compararon de acuerdo a la aparición o no de un evento infeccioso (bacteriano, viral o fúngico) o un episodio de rechazo en los primeros 45 días tras cada punto de monitorización, con independencia del momento post-trasplante en el que tuviera lugar la medición de iATP. En el caso de los eventos ocurridos tras el punto de monitorización basal (momento inmediatamente previo al trasplante) se consideraron los eventos ocurridos en los primeros 30 días tras la medición de iATP, puesto que la siguiente determinación de iATP se realizó al día +30 tras el trasplante. Los pacientes se calificaron como estables cuando no presentaron ningún evento en ese periodo. Se eliminaron del análisis los puntos de monitorización tras los cuales se produjeron dos eventos contradictorios, es decir, un episodio de rechazo y un episodio de infección, ya que al no disponer de una determinación intermedia de iATP entre un evento y otro no era posible valorar, por ejemplo, si en el caso de producirse primero un episodio de rechazo, la infección subsecuente estaba facilitada por una caída en el valor de iATP tras un incremento del tratamiento inmunosupresor o no. Se realizaron las comparaciones mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las áreas bajo la curva ROC (*receiver operating characteristics*) se calcularon para medir la capacidad de los valores de iATP en predecir el desarrollo subsecuente de infección. Se calculó el valor de iATP con mayor sensibilidad y especificidad para la predicción de infección mediante el estadístico J de Youden.

Se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,05$ . Todos los análisis se realizaron a dos colas. Se utilizaron los programas SPSS versión 20.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc, Chicago, IL) y EPIDAT versión 3.1 (Conselleria de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain) para la realización de los análisis estadísticos.

## **6. RESULTADOS**

## 6. Resultados

Durante el periodo del estudio se incluyeron un total de 103 casos que cumplían inicialmente los criterios de inclusión. Se excluyeron tres de esos 103 pacientes: uno porque el trasplante no se realizó por imposibilidad quirúrgica dada la importante aterosclerosis de la arteria iliaca del receptor; y dos porque requirieron un explante precoz del injerto por rechazo hiperagudo y no recibieron más tratamiento inmunosupresor. La cohorte quedó constituida finalmente por 100 pacientes, incluyendo dos casos con disfunción precoz del injerto que requirieron hemodiálisis en todo momento tras el trasplante, pero a los que no se explantó el riñón trasplantado inmediatamente y que, por lo tanto, continuaron recibiendo tratamiento inmunosupresor. La mediana de seguimiento tras el trasplante fue de 564 días, con un rango intercuartílico (Q1-Q3) de 464,0 a 646,8 días.

### 6.1 Descripción de la cohorte

#### 6.1.1 Características de los receptores y los donantes

##### a) *Características de los receptores*

La edad media de los receptores fue de 52,94 años (desviación estándar (DE): 16,98). El 59% de ellos eran varones. Un 45% presentaban alguna patología previa al trasplante, además de la enfermedad renal. Las más prevalentes fueron la diabetes *mellitus* (33%) y la cardiopatía (14%), tanto de etiología hipertensiva como isquémica (tabla 6). En cuanto a las serologías virales pre-trasplante, un 18% de los pacientes presentaban anticuerpos anti-HBc, todos ellos con HBsAg negativo; un 2% presentaban anticuerpos frente al virus de la hepatitis C; y un 92% tenía una serología IgG positiva frente a CMV. Sólo a cinco pacientes se les había realizado una prueba de la tuberculina (Mantoux), con resultado positivo en 2 de ellos, a los que se les administró tratamiento de infección tuberculosa latente con isoniazida antes del trasplante, durante seis meses. Cuatro pacientes habían

tenido una enfermedad tuberculosa previa tratada correctamente en el pasado.

**Tabla 6:** Características de los receptores de trasplante renal.

Variable	Número	%
Edad del receptor [media $\pm$ DE]	52.9 $\pm$ 16.9	
Sexo [varón]	59	59
Enfermedades pre-trasplante		
Diabetes <i>mellitus</i>	33	33
Patología cardíaca	14	14
Cardiopatía hipertensiva	5	5
Cardiopatía isquémica	6	6
Cardiopatía valvular	2	2
Otra	1	1
Patología pulmonar crónica (EPOC, asma, SAHS)	10	10
Hepatopatía crónica	4	4
Enfermedad inflamatoria intestinal	1	1
Enfermedad vascular periférica	3	3
Estado serológico pretrasplante		
AntiHBc + y HBsAg -	18	18
Anti VHC	2	2
CMV IgG +	92	74
Tratamiento renal sustitutivo previo	96	96
Hemodiálisis	82	82
Diálisis peritoneal ambulatoria continua	14	14
Trasplante previo	19	19
Renal*	16	16
Cardíaco	2	2
Hepático	1	1
Inmunosupresión en el momento del trasplante	8**	8

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; SAHS: Síndrome de apnea hipopnea del sueño; CMV: citomegalovirus; DE: desviación estándar.

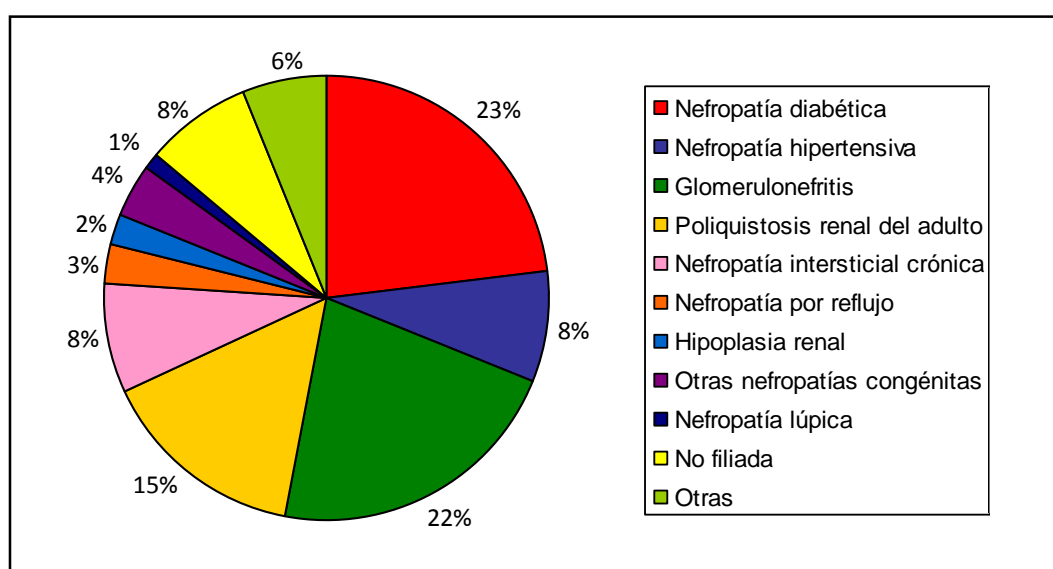
\* Dos de los 19 habían recibido dos trasplantes renales previamente.

\*\* Siete de origen farmacológico (micofenolato mofetil en cinco casos, combinado en cuatro de ellos con esteroides, ciclofosfamida, ciclosporina y/o rituximab; azatioprina con adalimumab en otro caso; y bortezomib con dexametasona, con adición posterior de lenalidomida en el último) y un paciente VIH.

Las causas de insuficiencia renal terminal se resumen en la figura 11. La nefropatía diabética (23%), la glomerulonefritis (22%) y la enfermedad renal poliquística del adulto (15%) fueron las etiologías más comunes. En el momento del trasplante 96 pacientes estaban recibiendo terapia renal sustitutiva: 85,4% hemodiálisis y 14,6% diálisis peritoneal ambulatoria continua. La mediana de tiempo en diálisis antes del trasplante fue de 576 días (Q1-Q3=300-1081 días). La cifra media de creatinina antes del trasplante fue de 7,28 mg/dl (DE=2,46).

Un total de 19 pacientes habían recibido un trasplante previo al actual (16 renales, dos cardíacos y un hepático). Dos de ellos habían recibido un trasplante renal en dos ocasiones antes del trasplante actual. Siete de los 100 pacientes estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor en el momento del trasplante actual y uno estaba infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con más de 500 linfocitos T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> en el momento del trasplante (tabla 6).

**Figura 11:** *Etiología de la insuficiencia renal terminal.*



### b) *Características de los donantes*

La edad media de los donantes fue 52,44 años (DE=16,37). El 65% eran varones. Un 46% fueron donantes tras muerte cardiorrespiratoria (donación en asistolia). Entre los donantes cadáver las causas de la muerte fueron: accidente cerebrovascular (55,6%), traumatismo craneoencefálico (27,8%) y encefalopatía post-anóxica (16.6%).

### c) *Serología de CMV en donantes y receptores*

En cuanto a la concordancia en la serología de CMV del donante y receptor, hubo 76 casos en los que tanto el donante como el receptor tenían serología CMV IgG positiva (D+/R+), 16 en los que la serología del donante era negativa y la del receptor positiva (D-/R+) y ocho en los que el donante tenía serología positiva y el receptor negativa, situación denominada *missmatch* (D+/R-).

## 6.1.2 Variables peritrasplante y pautas de inmunosupresión y profilaxis.

De los 100 pacientes trasplantados incluidos en el estudio, 98 recibieron un único riñón, dos pacientes dos riñones (al ser riñones de donantes añosos). El tiempo medio de isquemia fría fue de 16,25 horas (DE=6,21). La mediana de de incompatibilidades HLA entre el donante y el receptor fue de 5 (Q1-Q3 = 4-5).

El 87% de los trasplantados recibió tratamiento de inducción, bien mediante globulina antitimocítica policlonal (ATG) en el 67,8% de los que recibieron inducción, o con el anticuerpo monoclonal anti-CD25 (basiliximab) en el 32,2% restante. Un 81,4% de los pacientes que recibieron inducción con ATG tenían una edad inferior a 60 años. La pauta de inmunosupresión más empleada tras el trasplante fue la combinación de esteroides, tacrolimus y micofenolato mofetil (85%), seguida del uso de de esteroides, tacrolimus y azatioprina (13%). Seis pacientes (6%) recibieron rituximab: tres de ellos por presentar una alta tasa de anticuerpos anti-HLA donante específico; dos por estar hiperinmunizados al haber sufrido un rechazo agudo vascular previo

con rotura del injerto en un caso y por ser el tercer trasplante renal en otro; y un paciente lo recibió como profilaxis de recidiva de hialinosis segmentaria y focal sobre el injerto.

Al alta del ingreso para el trasplante recibieron profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol frente a *P. jirovecii* el 96% de los pacientes y profilaxis con valganciclovir frente a CMV el 57%.

## 6.2 Descripción de la monitorización inmunológica.

En todos los pacientes se determinó la concentración de iATP en el momento basal (inmediatamente antes del trasplante), mientras que las concentraciones de los meses 1, 3 y 6 se midieron en 86, 81 y 70 pacientes respectivamente. En 22 pacientes se realizaron determinaciones de iATP fuera de del calendario programado según el protocolo del estudio, es decir, más allá del sexto mes (54,5% en el mes 9; 31,8% en el mes 12; y 13,6% a los 15 meses del trasplante).

No hubo diferencias significativas entre aquellos pacientes en los que se realizaron menos de tres determinaciones de la concentración de iATP y aquellos en los que ésta se midió en tres o más ocasiones en cuanto a la administración de tratamiento de inducción (80% vs. 87,8%,  $p=0,615$ ) o el tipo de inmunosupresión ( $p=0,314$ ). Tampoco las hubo en relación al desarrollo de eventos tras el trasplante, ya se tratara de cualquier tipo de infección (50% vs. 60%,  $p=0,542$ ), infección oportunista (30 vs. 21,1%,  $p=0,687$ ), enfermedad por CMV (20% vs. 17,8%,  $p=1,000$ ) o rechazo agudo (40 vs. 22,2%,  $p=0,246$ ).

La media de iATP basal fue de 345,25 ng/ml (DE=149,39). En el mes 1 fue de 385,59 ng/ml (DE=169,85). En los meses 3 y 6 fue de 297,48 ng/ml (DE=147,23) y 265,98 ng/ml (DE=150,34) respectivamente. En la tabla 7 se muestra la distribución de los valores de iATP categorizados en cada uno de los puntos de monitorización.

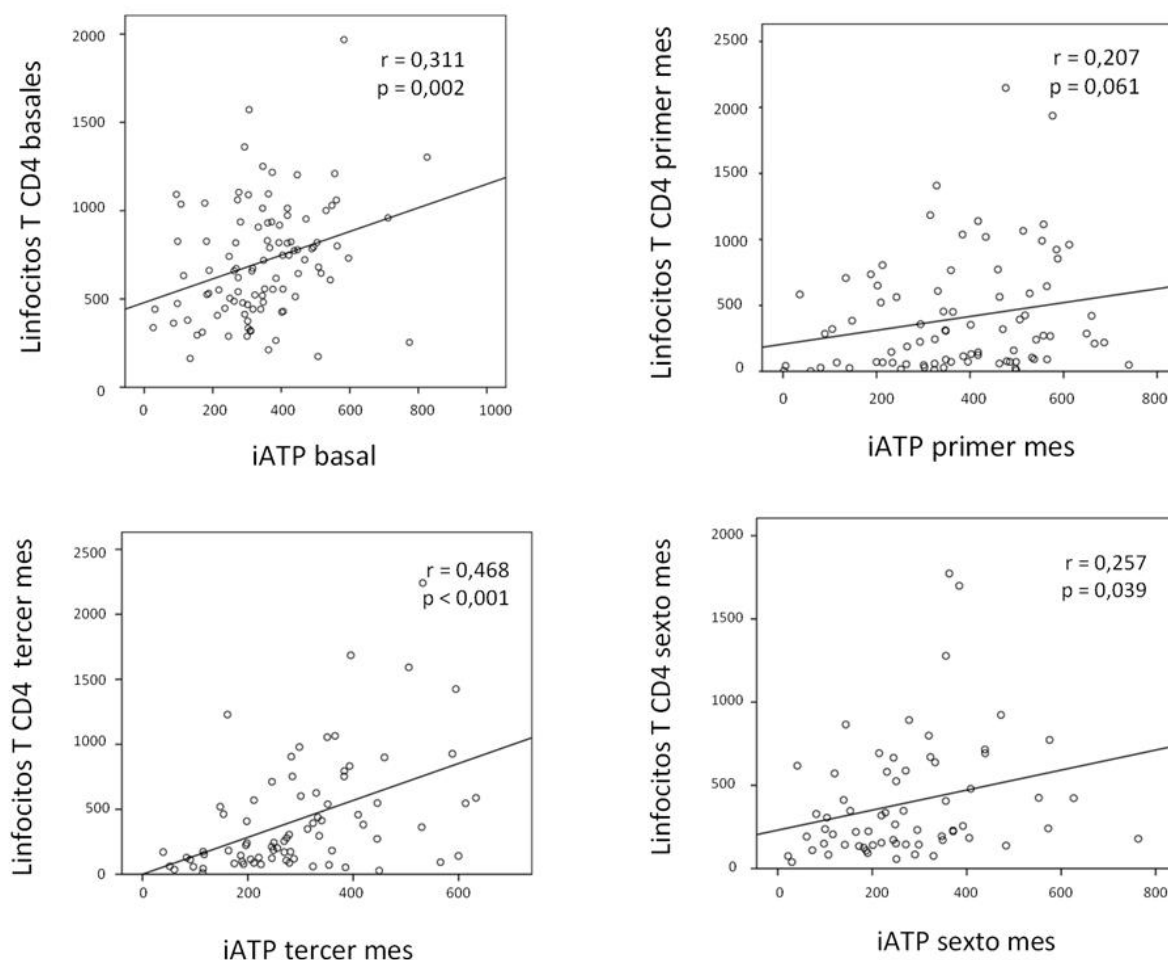


**Tabla 7:** Distribución de los valores de iATP en cada punto de monitorización.

% de valores de iATP en cada categoría según el momento de monitorización				
	Basal	Mes 1	Mes 3	Mes 6
<225 ng/ml	19 %	19,8 %	35,7 %	42,7 %
225-525 ng/ml	70 %	58,1 %	53,6 %	51,7 %
>525 ng/ml	11 %	22,1 %	10,7 %	5,6 %

Los linfocitos totales y las subpoblaciones linfocitarias T se cuantificaron en el 100% de los pacientes en el momento inmediatamente antes del trasplante (basal), en 96% en el mes 1, 87% en el mes 3 y 83% en el mes 6. A su vez, las inmunoglobulinas séricas y el Complemento se determinaron respectivamente en el 97% y 95% de los pacientes en el momento basal, 96% y 94% en el mes 1; 87% en ambos casos en el mes 3, y 84% y 82% en el mes 6.

Se observó una correlación positiva (aunque débil) entre los valores de iATP y la concentración de linfocitos TCD4+ en las determinaciones basales, del mes 3 y del mes 6 ( $r=0,311$  [ $p=0,002$ ],  $0,468$  [ $p<0,001$ ] y  $0,257$  [ $p=0,039$ ] respectivamente) (figura 12). No hubo correlación entre los valores de iATP y la cifra de linfocitos TCD8+ en ninguno de los meses de monitorización, salvo en el mes 3, con un coeficiente de correlación débil ( $r=0,247$ ,  $p<0,031$ ).

**Figura 12:** Correlación de los niveles de iATP y las cifras de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (\*).

(\*) Se determinaron de forma simultánea los valores de iATP y el número de linfocitos TCD4<sup>+</sup> en 100, 86, 81 y 70 pacientes respectivamente en el momento basal y en los meses 1, 3 y 6.

### 6.3 Descripción de los eventos post-trasplante

#### 6.3.1 Infección

Durante el seguimiento hubo 166 eventos de naturaleza infecciosa: 127 (76,5 %) de etiología bacteriana, 9 (5,4 %) fúngica y 30 (18,1%) vírica (tabla 8). La mediana de tiempo desde el trasplante hasta el desarrollo del primer evento infeccioso fue de 29,0 días (Q1-Q3=12,0-98,0 días). En 10 casos el

primer evento infeccioso ocurrió más allá de los seis meses tras el trasplante (infección tardía), con una mediana de tiempo hasta su aparición de 392,0 días (Q1-Q3=202,25-544,5 días). Hubo un total de 48 (28,9%) eventos infecciosos tardíos, independientemente de que fueran o no el primero.

Las infecciones bacterianas más frecuentes tras el trasplante fueron las del tracto urinario, tanto cistitis (36,2%) como pielonefritis (15,7%). Se identificó el agente etiológico en todas ellas. El microorganismo más frecuentemente aislado fue *Escherichia coli* (43,1%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (26,1%), fundamentalmente en urocultivos. Por otra parte, hubo 14 episodios de diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Hasta un 22% de las infecciones bacterianas tuvieron relación con el procedimiento quirúrgico, con infección de la herida quirúrgica en 16 casos y con infección profunda del lecho quirúrgico en 12. Estas últimas requirieron drenaje de colecciones en todos los casos. En tres casos la causa de las colecciones fue una fístula urinaria.

No hubo ninguna infección por hongo filamentoso. Los agentes etiológicos de las infecciones fúngicas fueron hongos levaduriformes (distintas especies de *Candida* en el 88,9% de los casos). Las candidurias asintomáticas no se incluyeron en el análisis. Hubo una esofagitis por *C. albicans* y cuatro infecciones del lecho quirúrgico en las que se aisló *C. albicans* en dos casos, *C. tropicalis* en uno y *Saccharomyces cerevisiae* en el otro.

Se produjeron 22 episodios de enfermedad por CMV en 19 pacientes, uno de los cuales presentó hasta tres episodios. La enfermedad se manifestó con un síndrome viral en 13 (59,1%) de los episodios y como afectación de órgano diana en 9 (40,9%). El órgano afectado fue el tracto gastrointestinal en todos los casos, con asociación de hepatitis en uno de ellos. No se realizó biopsia del órgano afectado en ninguno de los casos, pero se observó desaparición de la clínica gastrointestinal y/o de las alteraciones en las pruebas de función hepática tras el tratamiento con ganciclovir, por lo que se clasificaron como casos probables no probados. La mediana de tiempo desde el trasplante

hasta el desarrollo del primer episodio de enfermedad por CMV fue de 70 días (Q1-Q3=53-177 días). La enfermedad por CMV ocurrió tardíamente en cuatro casos (18,2%), en uno de ellos 375 días después del trasplante. La concordancia en la serología D/R para CMV en los 19 pacientes fue D+/R+ en 13 (68,4%), D-/R+ en 2 (10,5%) y *missmatch* (D+/R-) en 4 (21,1%). Diez de los pacientes (52,6%) habían recibido inducción con globulina antitimocítica policlonal (ATG) y 7 (36,8%) con basiliximab. Nueve pacientes (47,4%) habían recibido profilaxis universal con valganciclovir los primeros tres meses tras el trasplante al presentar factores de riesgo para desarrollar infección por CMV (inducción con ATG y/o *missmatch* serológico). Dos pacientes que habían recibido inducción con ATG no recibieron profilaxis universal por leucopenia grave ( $<350$  leucocitos/mm<sup>3</sup>) y posteriormente desarrollaron una enfermedad por CMV. Tres casos (15,8%) desarrollaron enfermedad por CMV mientras estaban recibiendo valganciclovir; de ellos, dos (66,6%) eran *missmatch* (D+/R-) en cuanto a la concordancia serología para CMV del donante y el receptor.

En cuanto a las infecciones por virus distintos de CMV, hubo un total de ocho. Dos casos de herpes zóster diseminado, dos infecciones graves por VHS (una estomatitis por VHS-1 y una infección genital por VHS-2) y cuatro infecciones respiratorias de etiología viral (tres por virus de la gripe y una por virus respiratorio sincitial). Cinco de ellas (62,5%) fueron tardías.

**Tabla 8:** Síndromes clínicos y agentes implicados en 166 episodios de infección a lo largo del periodo de estudio.

Tipo	Número	%
<b>Infección bacteriana</b>		
Infección del tracto genitourinario		
Cistitis	46	27,7
Pielonefritis aguda	20	12,0
Orquiepididimitis	3	1,8
Diarrea		
<i>Clostridium difficile</i>	14	8,4
Otros agentes	2	1,2
Infección intraabdominal	3	1,8
Infección del tracto respiratorio		
Neumonía	3	1,8
Bronquitis aguda	2	1,2
Infección de piel y partes blandas	16	9,6
Infección del lecho quirúrgico	12	7,2
Bacteriemia		
Bacteriemia primaria	2	1,2
Bacteriemia asociada a catéter	4	2,4
<b>Infección fúngica</b>		
Candidiasis orofaríngea	3	1,8
Candidiasis esofágica	1	0,6
Infección del lecho quirúrgico	4	2,4
Empiema pleural ( <i>Candida</i> spp.)	1	0,6
<b>Infección viral</b>		
Enfermedad por citomegalovirus (CMV)		
Síndrome viral	13	7,8
Afectación de órgano diana	9	5,4
VVZ	2	1,2
VHS	2	1,2
Virus respiratorio sincitial	1	0,6
Virus de la gripe	3	1,8

VVZ: virus varicela zoster; VHS: virus herpes simple

### 6.3.2 Rechazo

A lo largo del seguimiento se produjeron un total de 30 episodios de rechazo en 27 pacientes, ya que tres de ellos sufrieron dos episodios sucesivos. Hubo 26 (86,7%) episodios de rechazo agudo, 25 de los cuales se filiaron histológicamente, con 15 (60%) rechazos celulares, 5 (20%) humorales y 5 (20%) mixtos. Uno de los episodios de rechazo agudo no fue filiado histológicamente, pero se consideró como tal puesto que el paciente presentó deterioro agudo de la función renal asociado a la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase I, con buena respuesta al tratamiento esteroideo empírico. Los cuatro episodios restantes fueron de rechazo crónico (13,3%).

El tiempo mediano desde el trasplante hasta el primer episodio de rechazo agudo fue de 51,5 días (Q1-Q3=15,75-101,75), y de 343 días (Q1-Q3=191,25-660,5) hasta el desarrollo de rechazo crónico. Uno de los pacientes que desarrolló rechazo crónico había presentado un episodio rechazo agudo 69 días antes.

El 25% de los pacientes que desarrollaron rechazo agudo no habían recibido ningún tratamiento de inducción, el 29,2% basiliximab y 45,8% ATG. Cuatro habían recibido, además, rituximab en el momento del trasplante, tres de ellos por presentar anticuerpos anti-HLA donante específicos a títulos altos y uno por ser su tercer trasplante renal. Por otra parte, el 50% de los pacientes que desarrollaron rechazo crónico habían recibido inducción con basiliximab y el otro 50% con ATG.

Entre los pacientes que desarrollaron rechazo (agudo o crónico) el número mediano de incompatibilidades HLA fue de 5 (Q1-Q3=4-5). A su vez, un 25% de los pacientes que sufrieron un episodio de rechazo habían recibido un riñón de un donante en asistolia.

El tratamiento administrado en los casos de rechazo agudo humoral y en casos de rechazo agudo celular se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9:** *Tratamiento del rechazo agudo y crónico.*

Tipo de rechazo		Tratamiento administrado	N	%*
<b>AGUDO</b>	Humoral	Glucocorticoides + plasmaféresis + Ig	2	40
		Glucocorticoides + plasmaféresis + Ig + RTX	2	40
		Plasmaféresis + Ig	1	20
	Celular	Glucocorticoides	12	80
		Glucocorticoides + ATG	2	13,3
		Glucocorticoides + plasmaféresis + Ig	1	6,7
	Mixto	Glucocorticoides	2	40
		Glucocorticoides + plasmaféresis + Ig	2	40
		Glucocorticoides + plasmaféresis + Ig + RTX	1	20
	No filiado histológicamente	Glucocorticoides	1	100
<b>CRÓNICO</b>		Glucocorticoides	1	25
		Glucocorticoides + RTX	1	25
		Ningún tratamiento	2	50

\* % en función del subtipo histológico. Ig: inmunoglobulinas. RTX: rituximab. ATG: globulina antitimocítica policlonal.

### 6.3.3 Otros eventos

#### *a) Necesidad de diálisis post-trasplante*

El 65% de los pacientes requirieron diálisis en las primeras dos semanas tras el trasplante por retraso en la función del injerto. De ellos, un 47,7 % habían recibido un injerto de un donante en asistolia. El número medio de sesiones de hemodiálisis recibidas fue de 3,268 (DE=2,84). Todos los pacientes excepto dos recuperaron la función del injerto pasadas las dos semanas tras el trasplante.

b) *Estenosis de la arteria renal*

El 14% de los pacientes desarrollaron estenosis de la arteria renal, todas ellas moderadas salvo un caso que requirió angioplastia.

c) *Diabetes mellitus de novo post-trasplante.*

Hubo nueve pacientes que desarrollaron diabetes *mellitus* de novo post-trasplante y todos requirieron insulino terapia.

d) *Neoplasia de novo post-trasplante.*

En el periodo de seguimiento únicamente dos pacientes desarrollaron una neoplasia tras el trasplante. Uno de ellos presentó un melanoma que apareció 535 días tras el trasplante. El otro, un cáncer de piel no melanoma, de tipo espinocelular, 308 días tras el trasplante. Ninguno ellos falleció por este motivo.

#### 6.3.4 Mortalidad y supervivencia del injerto.

A lo largo del periodo de seguimiento hubo únicamente tres fallecimientos. Uno de ellos debido a infección y otro por un infarto de miocardio. No disponemos de información de la causa de muerte en el tercero de los casos, por haberse producido fuera de nuestro Hospital. El tiempo medio desde el trasplante hasta el fallecimiento fue de 350,33 días (DE=249,29). En el momento del fallecimiento la función del injerto era adecuada en los tres pacientes, que estaban libres de hemodiálisis.

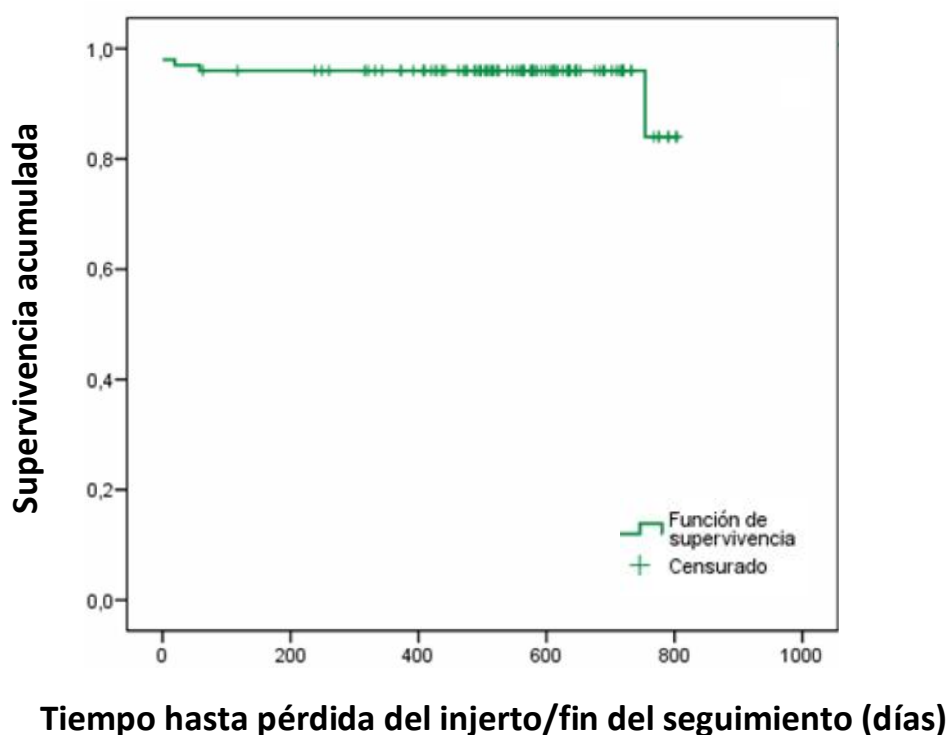
En cuanto a la supervivencia del injerto renal sólo cinco de los 100 pacientes (5%) perdieron el riñón trasplantado (figura 13). En dos casos el injerto nunca llegó a ser funcionante por rechazo humoral, con dependencia de hemodiálisis en todo momento tras el trasplante; en ambos pacientes se mantuvo la inmunosupresión, además de tratamiento específico del rechazo, ante la esperanza inicial de que recuperaran la función del injerto. En otros dos casos los pacientes requirieron alguna sesión de hemodiálisis en las dos



primeras semanas tras el trasplante, pero posteriormente recuperaron la función del injerto. Uno de ellos sufrió un rechazo humoral un mes después del trasplante y requirió entrada en diálisis de forma definitiva a los 58 días del trasplante. El otro presentó un rechazo celular con deterioro de la función renal a los 19 días tras el trasplante que no respondió al tratamiento con esteroides y ATG y precisó terapia sustitutiva renal desde ese momento. Finalmente, el paciente restante no necesitó diálisis en fases precoces, pero desarrolló un rechazo crónico con evolución progresiva hacia una insuficiencia renal crónica con necesidad de hemodiálisis 754 días tras el trasplante.

Se realizó transplantectomía en dos pacientes, en ambos casos de forma diferida, a los 108 días tras el trasplante en uno y a los 403 días en otro. En ambos casos la transplantectomía fue necesaria por síndrome de intolerancia al injerto, con febrícula persistente y elevación de reactantes de fase aguda.

**Figura 13:** *Curva de supervivencia del injerto (censurada por muerte).*



#### 6.4 Factores determinantes de los valores de iATP.

Se analizó la influencia de distintas variables sobre el valor de iATP en el momento inmediatamente previo al trasplante (iATP basal). Ninguna de las variables analizadas se asoció con un cambio significativo en el valor medio de iATP basal, aunque sí se observó una tendencia hacia un valor más bajo en aquellos pacientes con algún grado de inmunosupresión previo al trasplante, aunque sin llegar a la significación estadística. Por el contrario, hubo una tendencia hacia un valor más elevado de iATP entre los pacientes que no habían requerido diálisis antes del trasplante (tabla 10).

**Tabla 10:** *Influencia de distintas variables sobre valores basales de iATP (ng/ml).*

Variable (n)	Valor medio de iATP [ng/ml] basal (DE)	P
<b>Sexo</b>		
Varón (59)	360,05 (149,04)	0,237
Mujer (41)	323,97 (149,14)	
<b>Edad</b>		
≤ 60 años (63)	349,21 (153,21)	0,732
> 60 años (37)	338,53 (144,48)	
<b>DM previa</b>		
Sí (33)	365,728 (190,69)	0,407
No (67)	335,174 (124,63)	
<b>Inmunosupresión previa</b>		
Sí (8)	288,412 (204,95)	0,053
No (92)	350,199 (144,01)	
<b>Diálisis previa</b>		
Sí (82)	344,73 (147,91)	0,367
No (4)	459,57 (252,07)	
<b>Tiempo en diálisis previo</b>		
< 1 año (35)	365,77 (129,69)	0,204
≥ 1 año (60)	326,21 (151,58)	

DE: desviación estándar, DM: *diabetes mellitus*

Por otra parte, se analizaron los distintos factores que pudieran influir sobre los valores de iATP determinados tras la realización del trasplante, en los meses uno, tres y seis post-trasplante (tablas 11-13). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de iATP en función de ninguna de las variables analizadas, excepto en el caso del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, con unos valores de iATP significativamente menores en aquellos pacientes con recuentos inferiores a 150/mm<sup>3</sup> en los meses tres y seis. Hubo una tendencia hacia valores más elevados de iATP en los meses uno, tres y seis en aquellos pacientes que no recibieron previamente un tratamiento de inducción frente a los que sí lo recibieron. En la tabla 14 se muestra la evolución de los valores de iATP a lo largo del tiempo en los pacientes que recibieron inducción con globulina antitimocítica y el resto.

**Tabla 11:** *Influencia de distintas variables sobre valores de iATP en el primer mes.*

Variable (n)	Media de iATP [ng/ml] mes 1 (DE)	P
<b>Tratamiento de inducción</b>		
Sí (74)	363,76 (172,80)	0,109
No (12)	448,59 (134,22)	
<b>Tipo de inducción</b>		
ATG (51)	378,87 (181,16)	0,266
Basiliximab (23)	330,26 (150,96)	
<b>Número de linfocitos TCD4<sup>+</sup> mes 1</b>		
< 150/mm <sup>3</sup> (34)	335,63 (171,86)	0,066
> 150/mm <sup>3</sup> (49)	406,30 (168,59)	
<b>Necesidad de diálisis post-trasplante *</b>		
Sí (57)	354,79 (185,22)	0,110
No (29)	416,48 (127,91)	
<b>Rechazo antes de la medición de iATP del mes 1</b>		
Sí (10)	312,98 (165,08)	0,217
No (76)	383,84 (169,81)	
<b>Infección bacteriana antes de la medición de iATP del mes 1**</b>		
Sí (19)	392,70 (171,87)	0,622
No (67)	370,75 (170,27)	
<b>Enfermedad por CMV antes de la medición de iATP del mes 1</b>		
Sí (0)	-	-
No (86)	375,59 (169,86)	

\* Primeras dos semanas. \*\*Cistitis excluida del análisis. DE: desviación estándar, ATG: globulina antitumoral.

**Tabla 12:** *Influencia de distintas variables sobre valores de iATP en el tercer mes.*

Variable (n)	Media de iATP [ng/ml] mes 3 (DE)	P
Tratamiento de inducción		
Sí (73)	290,42(145,66)	0,193
No (8)	362,02 (155,64)	
Tipo de inducción		
ATG (51)	275,16 (157,03)	0,175
Basiliximab (22)	325,79 (110,25)	
Número de linfocitos TCD4 <sup>+</sup> en mes 3		
<150/mm <sup>3</sup> (25)	239,10 (145,21)	0,012
>150/mm <sup>3</sup> (51)	325,71 (135,06)	
Rechazo entre medición de iATP del mes 1 y 3		
Sí (6)	264,98 (191,19)	0,321
No (75)	300,09 (144,47)	
Infección bacteriana entre la medición de iATP del mes 1 y 3*		
Sí (15)	303,98 (155,43)	0,851
No (66)	296,01 (146,50)	
Enfermedad por CMV entre la medición de iATP del mes 1 y 3		
Sí (7)	236,29 (110,53)	0,252
No (74)	303,28 (149,53)	

\*Cistitis excluida del análisis. DE: desviación estándar, ATG: globulina antitimocito

**Tabla 13:** *Influencia de distintas variables sobre valores de iATP en el sexto mes.*

Variable (n)	Media de iATP [ng/ml] mes 6 (DE)	P
Tratamiento de inducción		
Sí (60)	258,00 (155,91)	0,280
No (10)	313,86 (104,71)	
Tipo de inducción		
ATG (51)	244,03 (152,85)	0,253
Basiliximab (22)	296,42 (162,75)	
Número de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en mes 6		
<150/mm <sup>3</sup> (17)	195,84 (118,01)	0,014
>150/mm <sup>3</sup> (48)	299,99 (155,18)	
Rechazo entre medición de iATP del mes 3 y 6		
Sí (6)	325,57 (161,71)	0,313
No (64)	260,39 (149,36)	
Infección bacteriana entre la medición de iATP del mes 3 y 6*		
Sí (9)	278,75 (182,17)	0,787
No (61)	264,09 (146,76)	
Enfermedad por CMV entre la medición de iATP del mes 3 y 6		
Sí (8)	253,63 (185,12)	0,807
No (62)	267,58 (147,01)	

\*Se ha excluido del análisis la cistitis. DE: desviación estándar, ATG: globulina antitimocito

**Tabla 14:** *Evolución de los valores de iATP (ng/ml) a lo largo del tiempo entre pacientes que han recibido globulina antitimocítica como tratamiento de inducción y el resto.*

Inducción	iATP mes 1	iATP mes 3	iATP mes 6	P
Globulina antitimocítica	378,87 (181,16)	275,16 (157,03)	244,03 (152,85)	0,018
Basiliximab	330,26 (150,96)	325,79 (110,25)	296,42 (162,75)	0,430
No inducción	448,59 (134,22)	362,02 (155,64)	313,86 (104,71)	0,641

## **6.5 Concentración de iATP y desarrollo de eventos en los 45 días siguientes a la monitorización con independencia del momento post-trasplante**

Se determinó la concentración de iATP en un total de 359 puntos de monitorización. Veintidós de los 359 puntos estaban fuera de los tiempos establecidos ya que se habían medido en los meses 9, 12 ó 15 tras el trasplante. Se registraron los eventos ocurridos después de cada uno de esos puntos de monitorización y antes de la siguiente determinación de iATP. Se recogieron tanto los eventos infecciosos (bacterianos, virales y fúngicos) como los episodios de rechazo.

Se eliminaron del análisis ocho puntos de monitorización puesto que después de dichas determinaciones de iATP se produjeron dos eventos contradictorios, es decir, un episodio de rechazo y un episodio de infección. Por lo tanto, finalmente se analizaron los eventos ocurridos en los primeros 30 a 45 días, tras un total de 351 puntos de monitorización.

### **6.5.1 Concentración de iATP y desarrollo posterior de cualquier evento**

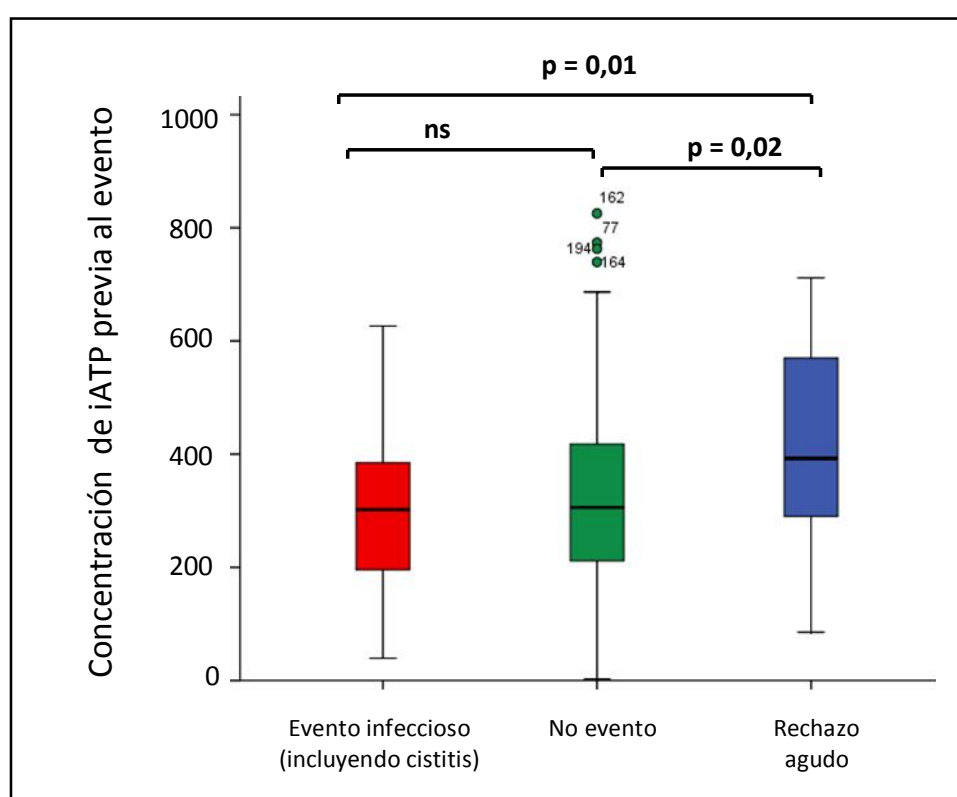
En los primeros 45 días tras un punto de monitorización (primeros 30 días tras la medición de la concentración de iATP basal) ocurrieron 67 eventos infecciosos y 16 episodios de rechazo. De los 67 eventos infecciosos, 15 fueron infecciones del tracto urinario inferior sintomáticas.

La concentración media de iATP previa a un evento infeccioso de cualquier tipo fue 303,65 ng/ml (DE=146,45) y la previa a un episodio de rechazo fue 415,81 ng/ml (DE=176,24). La concentración media de iATP tras cuya determinación no ocurrió ningún evento adverso fue 320,34 ng/ml (DE=158,31).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de iATP al comparar los tres grupos de forma global ( $p=0,037$ ). Estas diferencias se mantuvieron al comparar tanto el grupo que

presentó un evento infeccioso como el grupo que no presentó ningún evento, con aquellos que presentaron rechazo. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas al comparar el grupo que presentó un evento infeccioso tras el punto de monitorización con el que no presentó ningún evento ( $p=0,434$ ) (Figura 14).

**Figura 14:** Concentración de iATP previa a eventos ocurridos en los primeros 45 días tras la monitorización (se considera la cistitis como un evento infeccioso significativo).



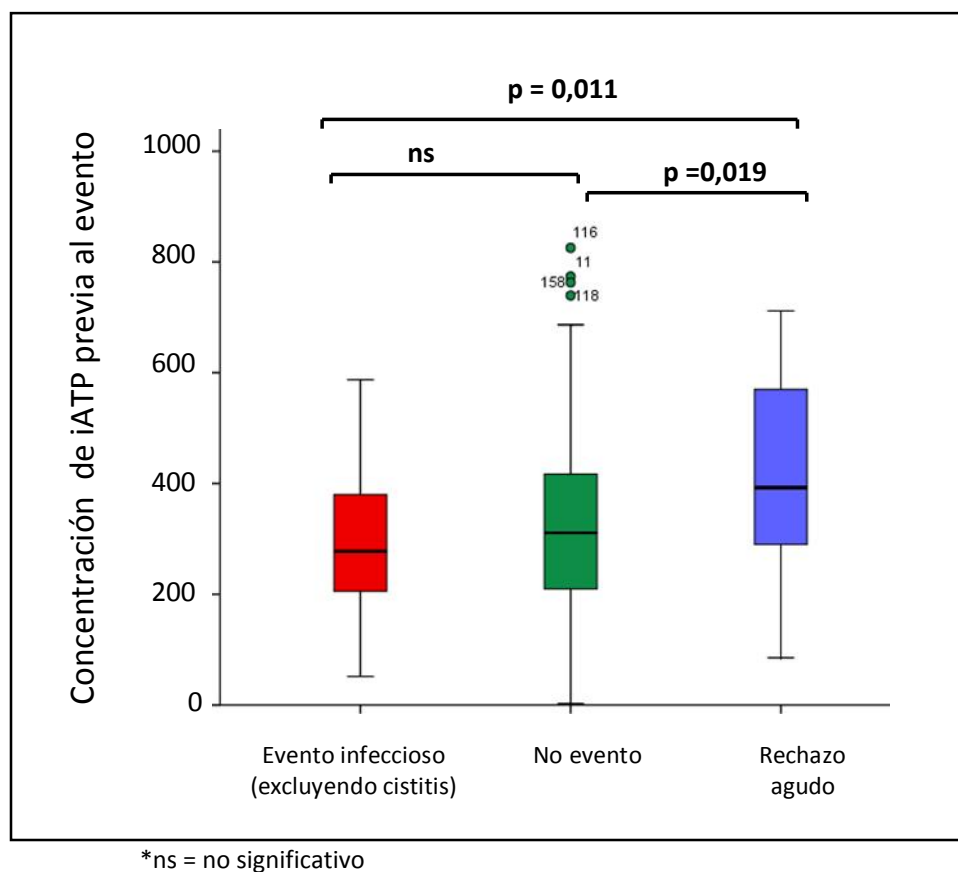
\*ns: no significativo

Se repitió el análisis sin incluir la ITU baja sintomática como un evento infeccioso significativo, al considerarla como debida a alteraciones anatómicas y funcionales tras el trasplante y no tanto una infección relacionada con la inmunosupresión. De este modo, en los primeros 45 días tras un punto de monitorización (30 primeros días tras la determinación de iATP basal) ocurrieron 52 eventos infecciosos y 16 episodios de rechazo. No se produjo ningún evento tras 283 determinaciones de iATP.



La concentración media de iATP previa a un evento infeccioso (excluyendo cistitis) fue 304,14 ng/ml (DE=140,73) y la previa a un episodio de rechazo 415,81 ng/ml (DE=176,24). La concentración media de iATP tras cuya determinación no ocurrió ningún evento fue 319,37 ng/ml (DE=158,69). También en este análisis, excluyendo la ITU baja sintomática como evento infeccioso significativo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de iATP entre los tres grupos de forma global ( $p=0,041$ ). Estas diferencias en la media de iATP no fueron significativas al comparar el grupo que presentó un evento infeccioso tras el punto de monitorización con el que no presentó ningún evento ( $p=0,518$ ) (Figura 15).

**Figura 15:** Concentración de iATP previa a eventos ocurridos en los primeros 45 días tras la monitorización (se excluye cistitis como evento infeccioso significativo).



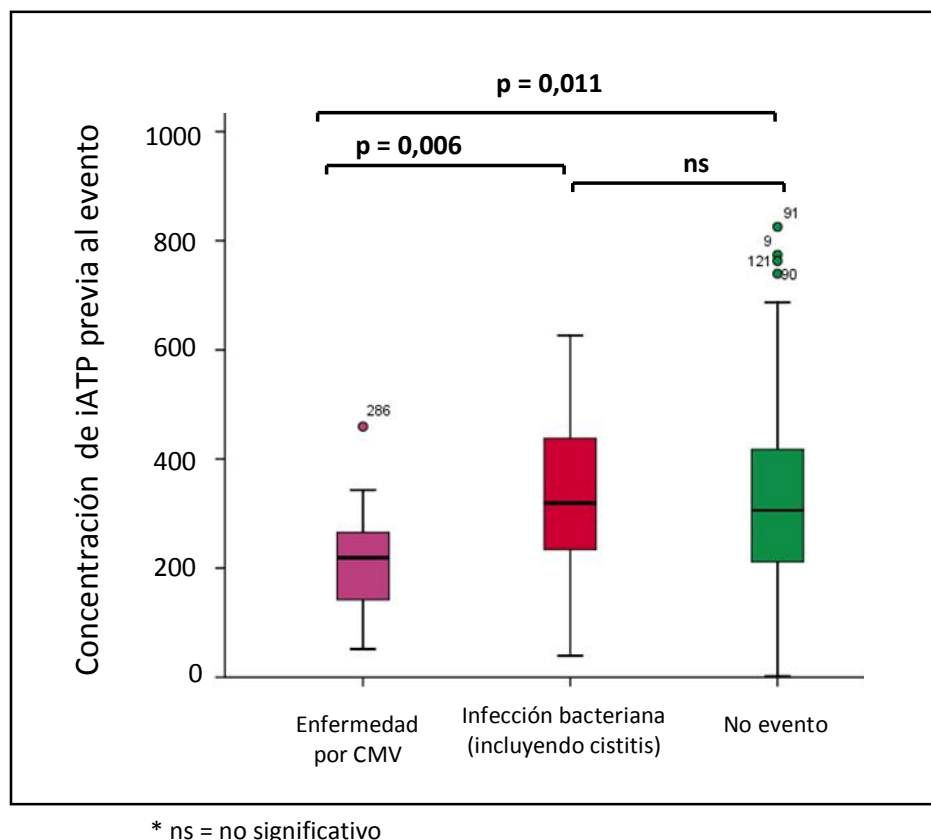
#### 6.5.2 Concentración de iATP y desarrollo posterior de distintos tipos de eventos infecciosos

Se analizaron y compararon las concentraciones de iATP previas a cada tipo de infección, comparándolas entre sí y con las concentraciones de iATP tras cuya medición no ocurrió ningún evento. Únicamente las infecciones bacterianas y la infección por CMV pudieron ser valoradas, pues tanto los eventos infecciosos fúngicos como virales distintos de CMV no fueron lo suficientemente frecuentes como para ser analizados.

Se registraron un total de 49 eventos infecciosos bacterianos, incluyendo 15 episodios de ITU baja sintomática, en los primeros 45 días tras la medición de iATP (30 primeros días tras la determinación de iATP basal). La concentración media de iATP previa a la infección bacteriana fue 333,10 ng/ml (DE=150,40). Por otra parte, hubo 18 episodios de enfermedad por CMV [incluyendo síndrome viral (11) y afectación de órgano diana (7)] en los primeros 45 días tras la medición de iATP (30 primeros días tras la determinación de iATP basal). La concentración media de iATP previa a dichos eventos fue 223,47 ng/ml (DE=100,43). Tras 268 puntos de monitorización de iATP no se produjo ningún evento en el periodo de tiempo establecido. La concentración media de iATP en este grupo fue de 320,34 ng/ml (DE=158,31).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar de forma global las medias de iATP en los tres grupos ( $p=0,028$ ). No obstante, estas diferencias no fueron significativas al comparar la media de iATP previa a un evento infeccioso bacteriano con la media de iATP tras la cual no hubo ningún evento ( $p=0,602$ ). Sin embargo, la media de iATP previa a un episodio de enfermedad por CMV fue significativamente menor que la media de iATP previa a un evento infeccioso bacteriano ( $p=0,006$ ) y también significativamente menor que la media de iATP tras cuya medición no se produjo ningún evento ( $p=0,011$ ). Estos datos se resumen en la figura 16.

**Figura 16:** Concentración de iATP previa a los distintos tipos de eventos infecciosos ocurridos en los primeros 45 días tras la monitorización (se considera la cistitis como un evento infeccioso bacteriano significativo).

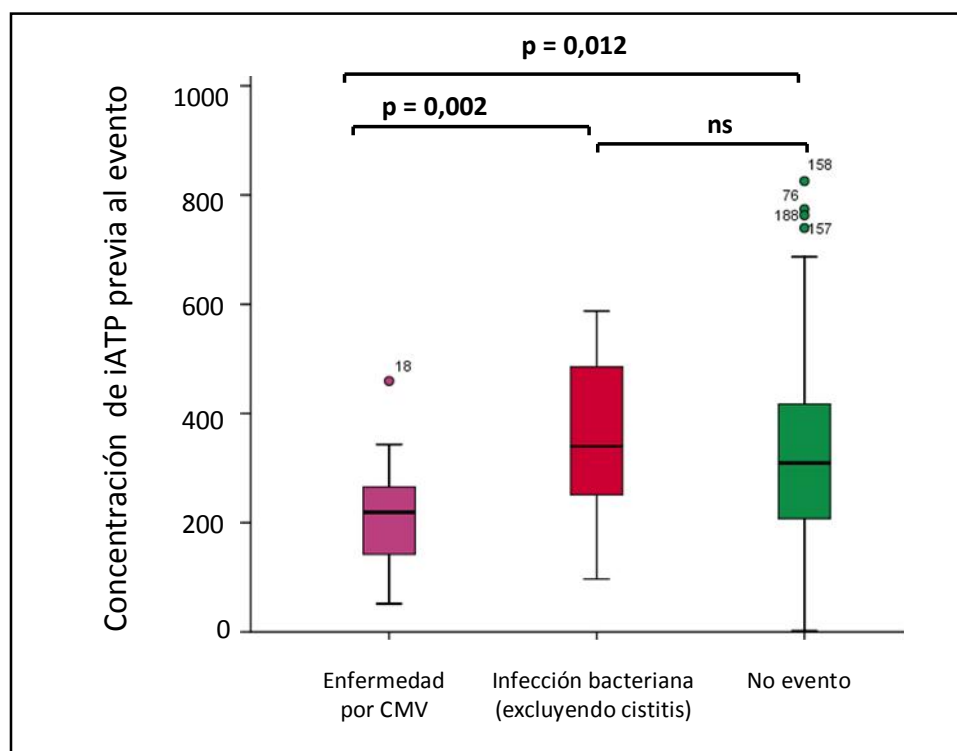


Teniendo en cuenta las consideraciones previas sobre la cistitis, se repitió el análisis sin considerar la ITU baja sintomática como un evento infeccioso bacteriano significativo.

Así pues, se registraron 34 eventos infecciosos bacterianos (sin considerar la cistitis como un evento significativo) en los primeros 45 días tras un punto de monitorización (30 primeros días tras la determinación de iATP basal) con una concentración media de iATP previa al evento de 346,85 ng/ml (DE=141,36). Hubo 18 episodios de enfermedad por CMV, con una concentración media de iATP previa al episodio de 223,47 ng/ml (DE=100,43). Por otra parte, la concentración media de iATP de las 283 determinaciones

tras cuya medición no se produjo ningún evento fue 319,37 ng/ml (DE=158,69). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar de forma global las medias de iATP en los tres grupos ( $p=0,020$ ). En la figura 17 se muestran las comparaciones entre las distribuciones de iATP previas a un evento infeccioso, un episodio de enfermedad por CMV o la ausencia de un evento tras el punto de monitorización, realizadas dos a dos. La media de iATP previa a un episodio de enfermedad por CMV fue significativamente menor que la media de iATP previa a un evento infeccioso bacteriano ( $p=0,002$ ) y también significativamente menor que la media de iATP tras cuya medición no se produjo ningún evento ( $p=0,012$ ). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la concentración media de iATP previa a un evento infeccioso bacteriano y la concentración media de iATP tras la cual no se produjo ningún evento ( $p=0,335$ ).

**Figura 17:** Concentración de iATP previa a los distintos tipos de eventos infecciosos ocurridos en los primeros 45 días tras la monitorización (se excluye cistitis del análisis como evento infeccioso bacteriano significativo).



\* ns = no significativo

## **6.6 Distribución de los grados de respuesta inmune en función del evento desarrollado tras cada punto de monitorización**

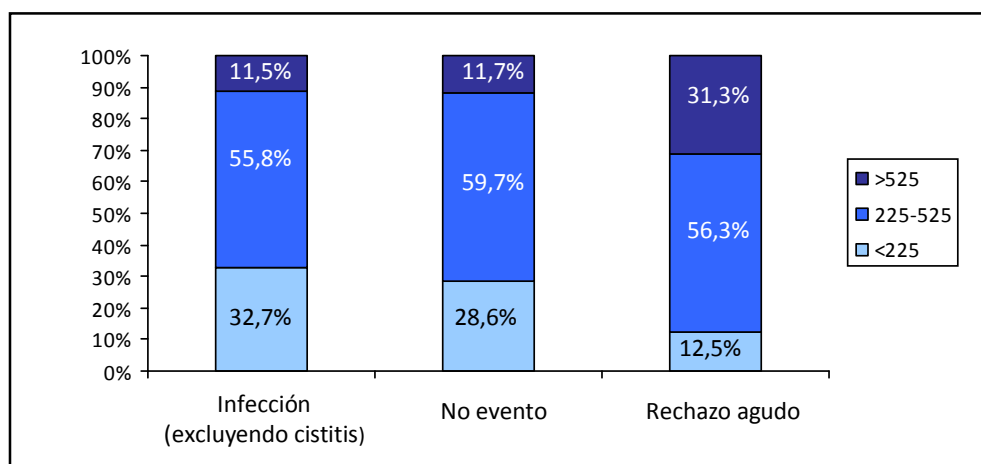
De acuerdo a los rangos establecidos por Kowalski *et al* [94] para definir el grado de respuesta inmune, los valores de iATP se agruparon en 3 categorías: valores inferiores a 225 ng/ml, correspondientes con una respuesta inmune débil; entre 225 y 525 ng/ml, correspondientes con una respuesta inmune moderada; y en valores superiores a 525 ng/ml, correspondientes con una respuesta inmune fuerte. Se analizó la distribución de los grados de respuesta inmune entre cada evento desarrollado.

### **6.6.1 Distribución de los grados de respuesta inmune entre eventos (infección o rechazo) y no eventos**

En la figura 18 se muestra la distribución de las categorías de iATP entre los eventos desarrollados en los primeros 45 días tras un punto de monitorización (primeros 30 días en el caso de la determinación basal de iATP).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los grados de respuesta inmune entre aquellos que presentaron un episodio de rechazo, un episodio de infección (sin considerar como evento infeccioso significativo la cistitis) o aquellos que no presentaron ningún evento ( $p=0,160$ ). En el grupo de rechazo había un porcentaje más elevado de valores de iATP superiores a 525 ng/ml, con respecto a los demás grupos.

**Figura 18:** Distribución de los grados de respuesta inmune en función del evento desarrollado.

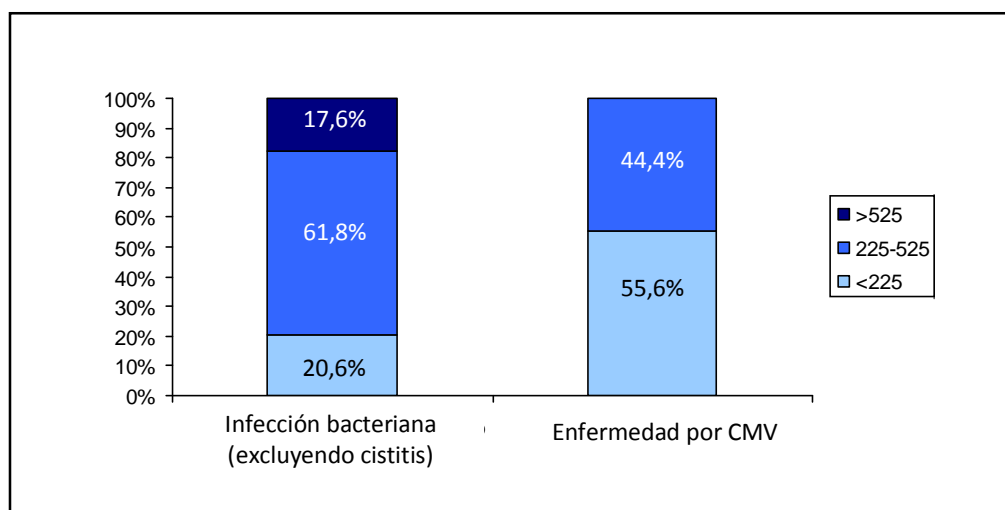


#### 6.6.2 Distribución de los grados de respuesta inmune entre eventos infecciosos

Se analizó la distribución de los grados de respuesta inmune entre los eventos infecciosos bacterianos (no considerando como evento significativo la cistitis) y los episodios de enfermedad por CMV que tuvieron lugar en los primeros 45 días tras un punto de monitorización (primeros 30 días tras la determinación de iATP basal). La escasez de eventos fúngicos y virales distintos de CMV impidió realizar el análisis en esos casos.

No hubo ningún valor de iATP superior a 525 ng/ml previo al desarrollo de un episodio de enfermedad por CMV. Lo más frecuente, hasta en el 55,6% de los casos, fue encontrar un grado de respuesta inmune débil. Esta distribución de los grados de respuesta inmune entre los episodios de infección por CMV fue significativamente diferente a la observada en los casos de infección bacteriana (excluyendo la cistitis del análisis), con un valor p de 0,016 (figura 19).

**Figura 19:** Distribución de los grados de respuesta inmune en función del evento desarrollado.



### 6.7 Relación entre el grado de respuesta inmune en los momentos de monitorización establecidos y el desarrollo posterior de eventos infecciosos en los distintos periodos post-trasplante

Para cada uno de los momentos de medición de la concentración de iATP preestablecidos en el estudio, es decir, basal (en el momento del trasplante) y a los meses 1, 3 y 6 tras el trasplante, los valores de iATP se agruparon en tres categorías: valores inferiores a 225 ng/ml (respuesta inmune débil); entre 225 y 525 ng/ml (respuesta inmune moderada); y superiores a 525 ng/ml (respuesta inmune fuerte).

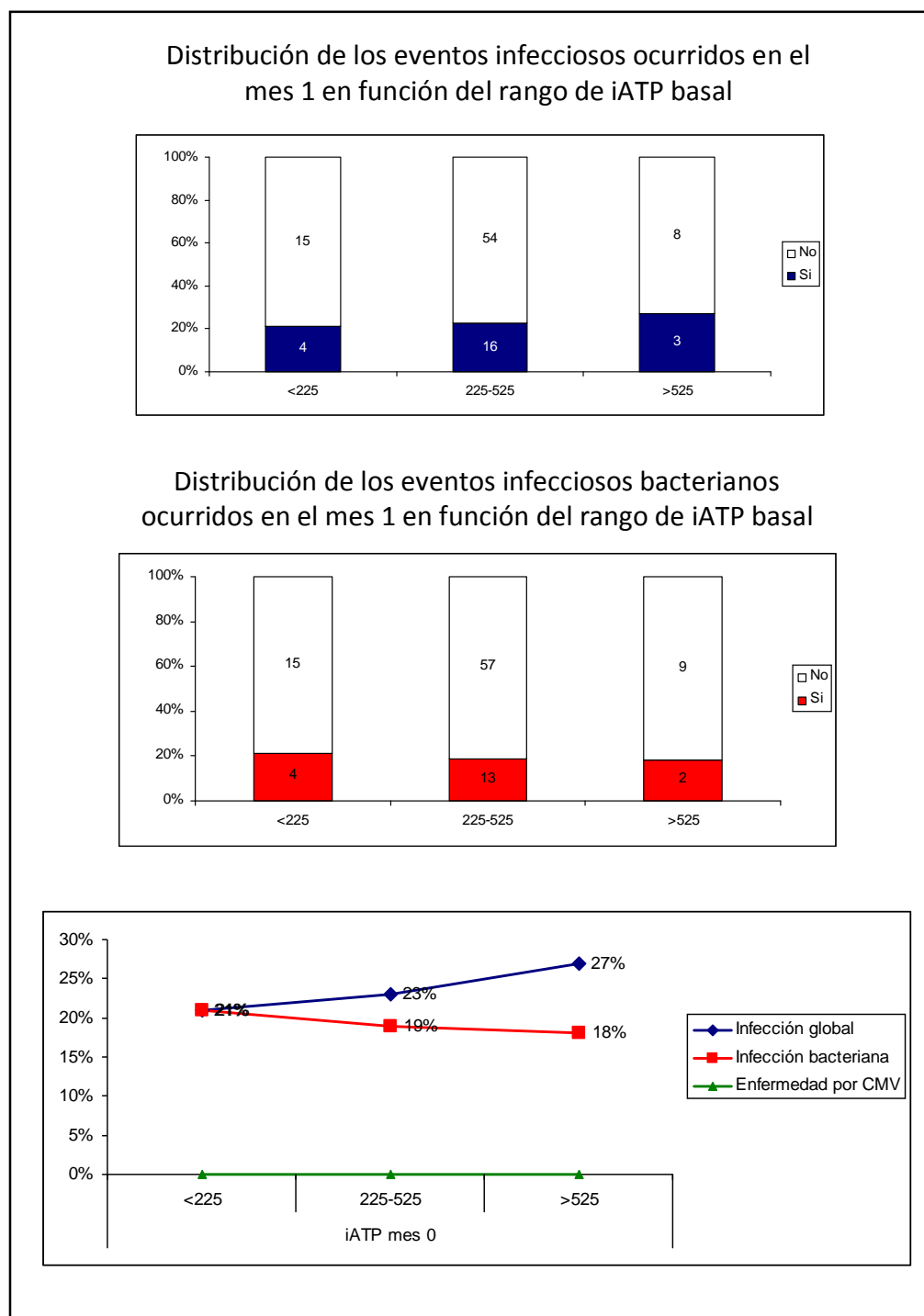
Se analizó el desarrollo posterior de eventos infecciosos en el periodo post-trasplante subsiguiente. Así pues, tras la determinación basal se registraron los eventos ocurridos en el periodo post-trasplante precoz, es decir, el primer mes tras el mismo; después de la determinación del primer mes, los eventos ocurridos en el periodo intermedio, es decir entre el segundo y sexto mes tras el trasplante; y, finalmente, tras la determinación del sexto mes, los eventos ocurridos en el periodo tardío, más allá del sexto mes tras la cirugía.

#### 6.7.1 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante precoz según el grado de respuesta inmune en el momento del trasplante

Se midió el valor de iATP basal en 100 pacientes en el momento del trasplante. En el primer mes tras el mismo, 23 pacientes desarrollaron al menos un evento infeccioso. De ellos, 19 fueron infecciones bacterianas, no considerando la cistitis como tal. Hubo dos infecciones virales distintas de CMV (una gripe y una infección por VRS) y dos infecciones fúngicas. No se produjo ningún episodio de enfermedad por citomegalovirus. Como se muestra en la figura 20, no se observó un gradiente en la distribución de eventos en función del grado de respuesta inmune ni analizando los eventos infecciosos de forma global (test de tendencias de Mantel-Haenszel  $p=0,714$ ) ni analizando únicamente los eventos infecciosos bacterianos (test de tendencias de Mantel-Haenszel  $p=0,822$ ).



**Figura 20:** Distribución de infecciones ocurridas en el primer mes post-trasplante en función del grado de respuesta inmune en el momento basal.



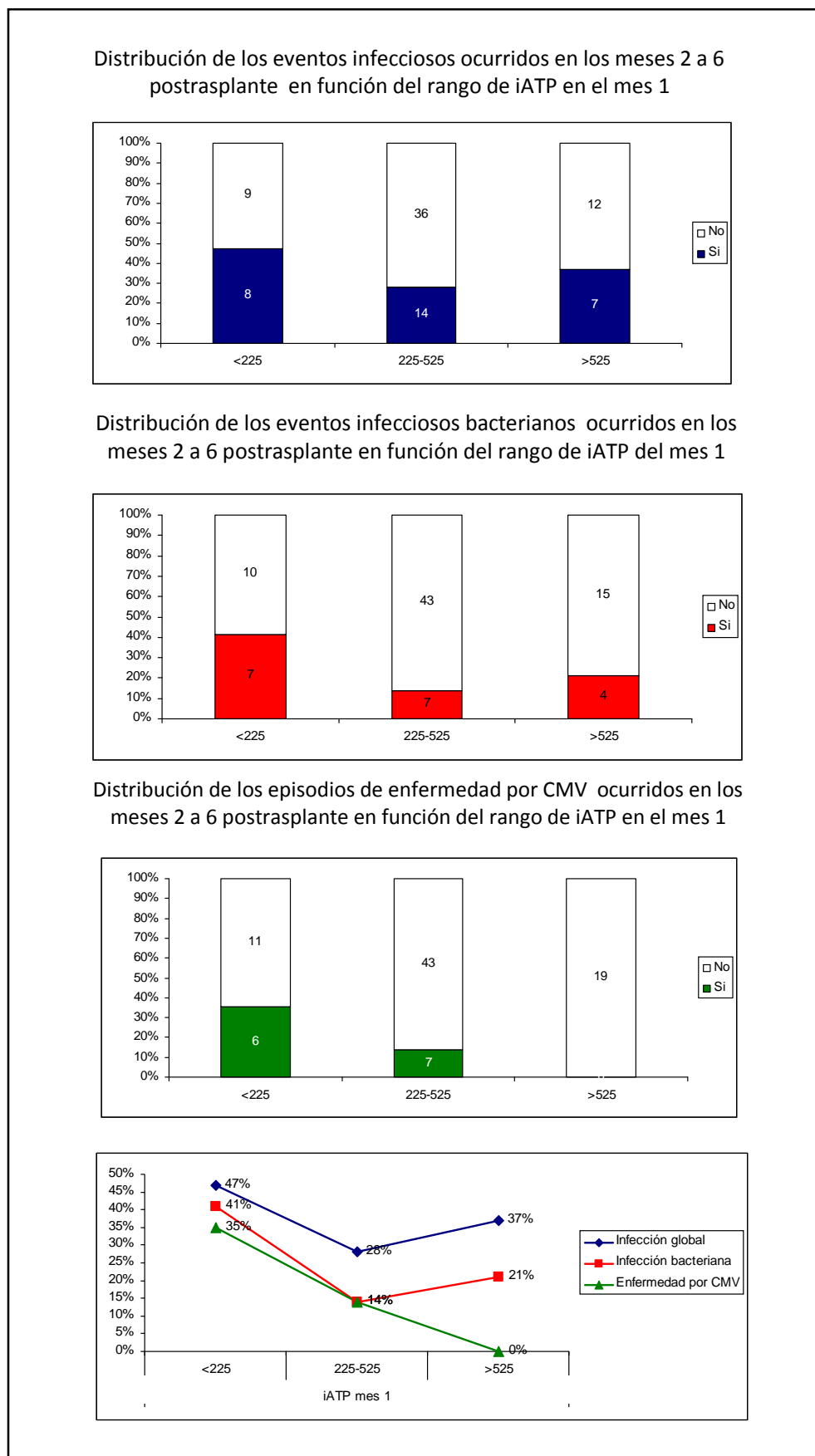
#### 6.7.2 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante intermedio según el grado de respuesta inmune en el primer mes

En 86 de los 100 pacientes trasplantados se midió el iATP al mes del trasplante. En el periodo post-trasplante intermedio, es decir entre los meses 2 y 6, entre aquellos 86 pacientes hubo 29 que presentaron al menos un evento infeccioso. De ellos, 18 pacientes presentaron una infección bacteriana y 14 un episodio de enfermedad por CMV. Cinco pacientes presentaron una infección viral y tres una infección fúngica, pero, ante el bajo número de eventos, no se analizó la distribución de dichos episodios entre los grados de respuesta inmune en el mes 1.

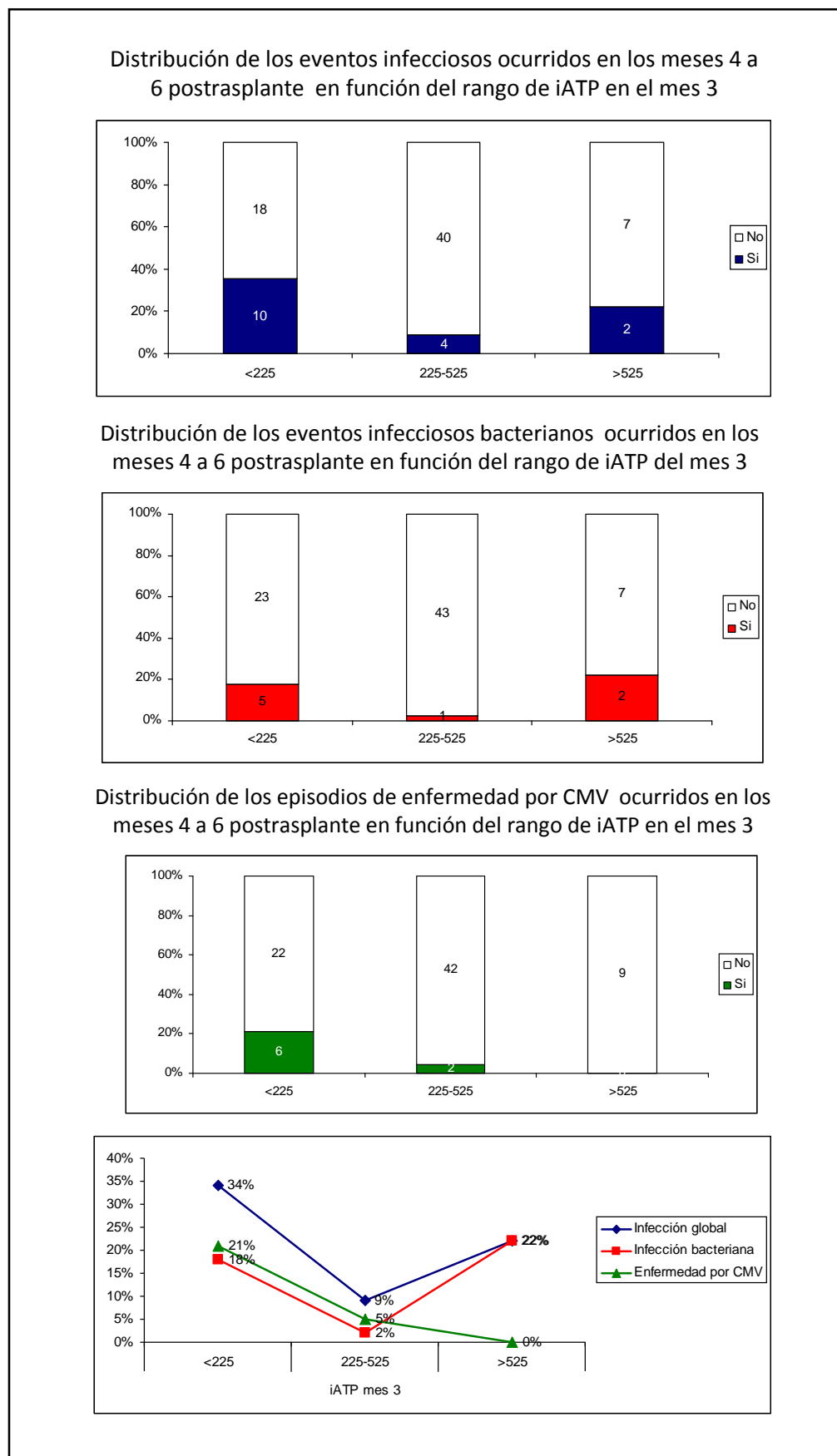
No se observó un gradiente en la distribución de eventos en función del grado de respuesta inmune ni al analizar los eventos infecciosos de forma global (test de tendencias de Mantel-Haenszel  $p=0,557$ ) ni al hacerlo únicamente con los eventos infecciosos bacterianos (test de tendencias de Mantel-Haenszel  $p=0,1635$ ). Sin embargo, sí se observó claramente un gradiente en la distribución de episodios de enfermedad por CMV en función del grado de respuesta inmune (test de tendencias de Mantel-Haenszel  $p=0,004$ ), con mayor prevalencia de los mismos en el grupo de respuesta inmune débil ( $iATP < 225$  ng/ml) (figura 21)

Se realizó un subanálisis analizando el desarrollo de eventos infecciosos entre los meses 4 y 6 tras la determinación del grado de respuesta inmune en el mes 3, punto en el cual se midió el iATP en un total de 81 pacientes. Se obtuvieron resultados similares, como muestra la figura 22.

**Figura 21:** Distribución de infecciones ocurridas entre los meses 2 y 6 post-trasplante en función del grado de respuesta inmune en el mes 1.



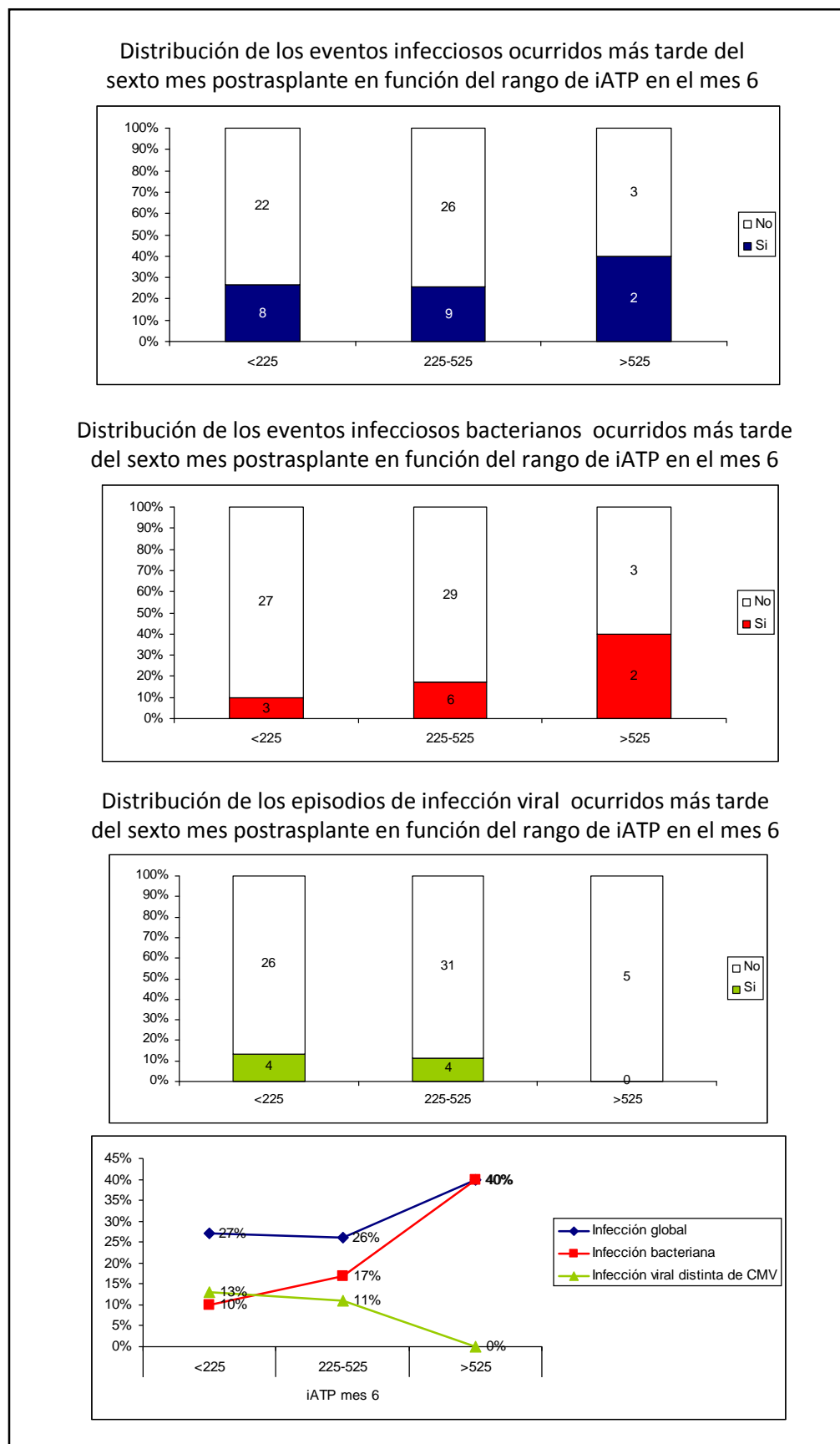
**Figura 22:** Distribución de infecciones ocurridas entre los meses 4 y 6 post-trasplante en función del grado de respuesta inmune en el mes 3.



### 6.7.3 Eventos infecciosos durante el periodo post-trasplante tardío según el grado de respuesta inmune en el sexto mes

El iATP en el sexto mes se midió únicamente en 70 pacientes. De ellos, 19 presentaron algún evento infeccioso tardío. Once pacientes desarrollaron un evento infeccioso bacteriano, únicamente dos un episodio de enfermedad por citomegalovirus y ocho pacientes un episodio de infección viral distinto de CMV. En este caso, parecía existir un gradiente en la distribución de eventos en función del grado de respuesta inmune en el caso de la infección bacteriana, con una mayor prevalencia de eventos en el grupo de respuesta inmune fuerte (iATP>525 ng/ml), si bien no se observó una significación estadística en el test de tendencias de Mantel-Haenszel para dicha distribución ( $p=0,118$ ). En el caso de la infección viral distinta de CMV también parecía existir un gradiente en la distribución de eventos con mayor prevalencia de los mismos en el grupo de respuesta inmune débil, pero el test de tendencias tampoco demostró significación estadística en dicha distribución ( $p=0,485$ ). El número de episodios de enfermedad por CMV fue tan escaso que el análisis no fue valorable (figura 23).

**Figura 23:** Distribución de infecciones ocurridas en el periodo post-trasplante tardío en función del grado de respuesta inmune en el mes 6.



## 6.8 Supervivencia libre de infección en función del grado de respuesta inmune

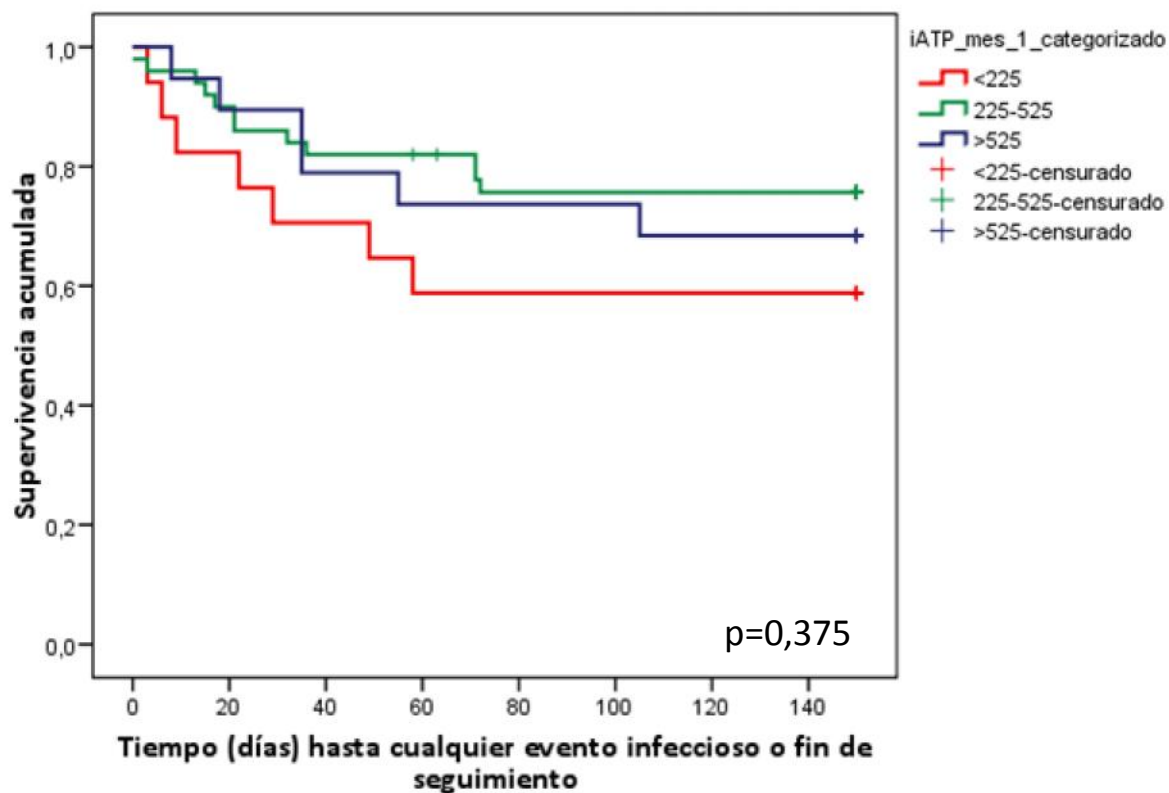
Se calculó el tiempo desde la medición del iATP del mes 1 hasta el desarrollo de un evento infeccioso durante el periodo post-trasplante intermedio (desde el mes 1 al mes 6 post-trasplante), en función del grado de respuesta inmune, y se comparó el tiempo libre de eventos entre los tres grupos.

Asimismo, se analizó de forma conjunta la supervivencia libre de infección de cualquier tipo, incluyendo infecciones bacterianas, fúngicas, virales distintas de CMV y enfermedad por CMV. Posteriormente se analizó de forma individualizada la supervivencia libre de infección bacteriana y supervivencia libre de enfermedad por CMV. Las cistitis no se incluyeron en el análisis de infecciones bacterianas. No se analizaron de forma individualizada las infecciones fúngicas o virales distintas de CMV, al ser el número de casos muy escaso.

### 6.8.1 Supervivencia libre de infección de cualquier tipo

La figura 24 muestra la supervivencia libre de eventos infecciosos de cualquier tipo ocurrido en el periodo post-trasplante intermedio en función del valor de iATP del mes 1. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo hasta el evento entre aquellos con grado de respuesta inmune débil, intermedio o fuerte (Log-Rank  $p=0,357$ ).

**Figura 24:** Curva de supervivencia libre de infección de cualquier tipo en función del grado de respuesta inmune en el mes 1 post-trasplante.

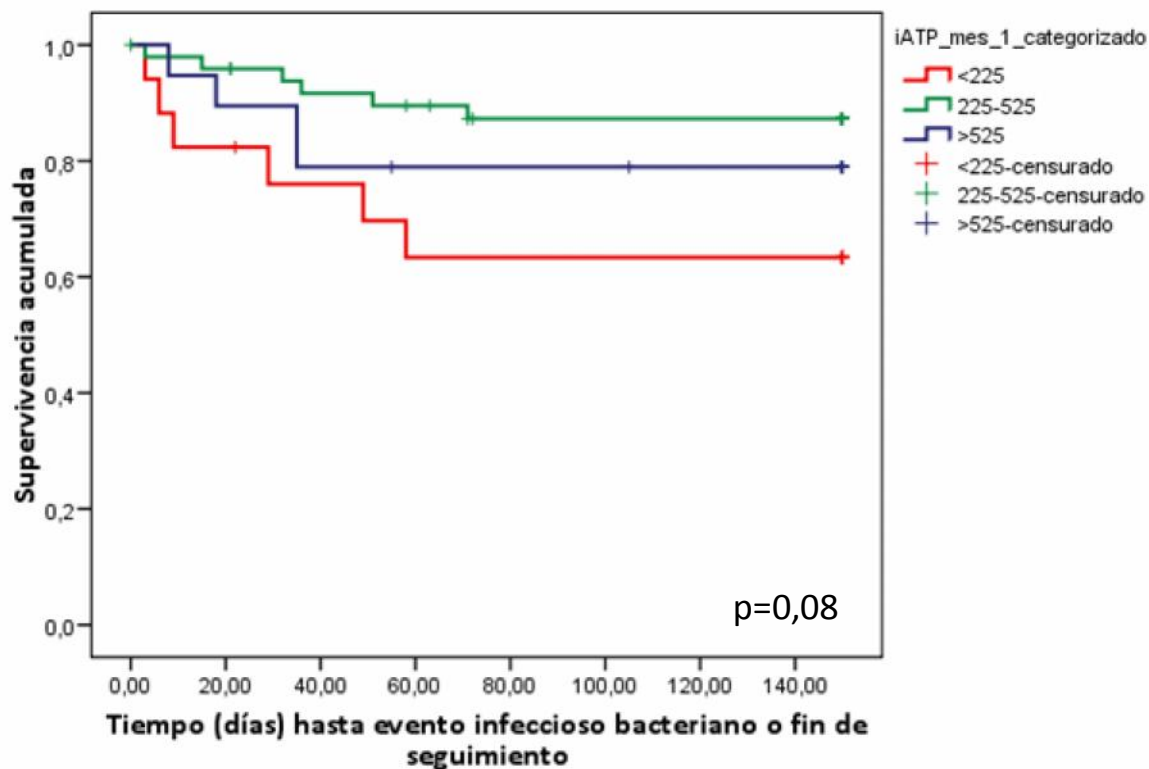


#### 6.8.2 Supervivencia libre de infección bacteriana

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de infección bacteriana a lo largo del periodo post-trasplante intermedio entre aquellos con grado de respuesta inmune débil, intermedio o fuerte, tras la medición de iATP del mes 1 (Log-Rank  $p=0,08$ ), como se muestra en la figura 25.



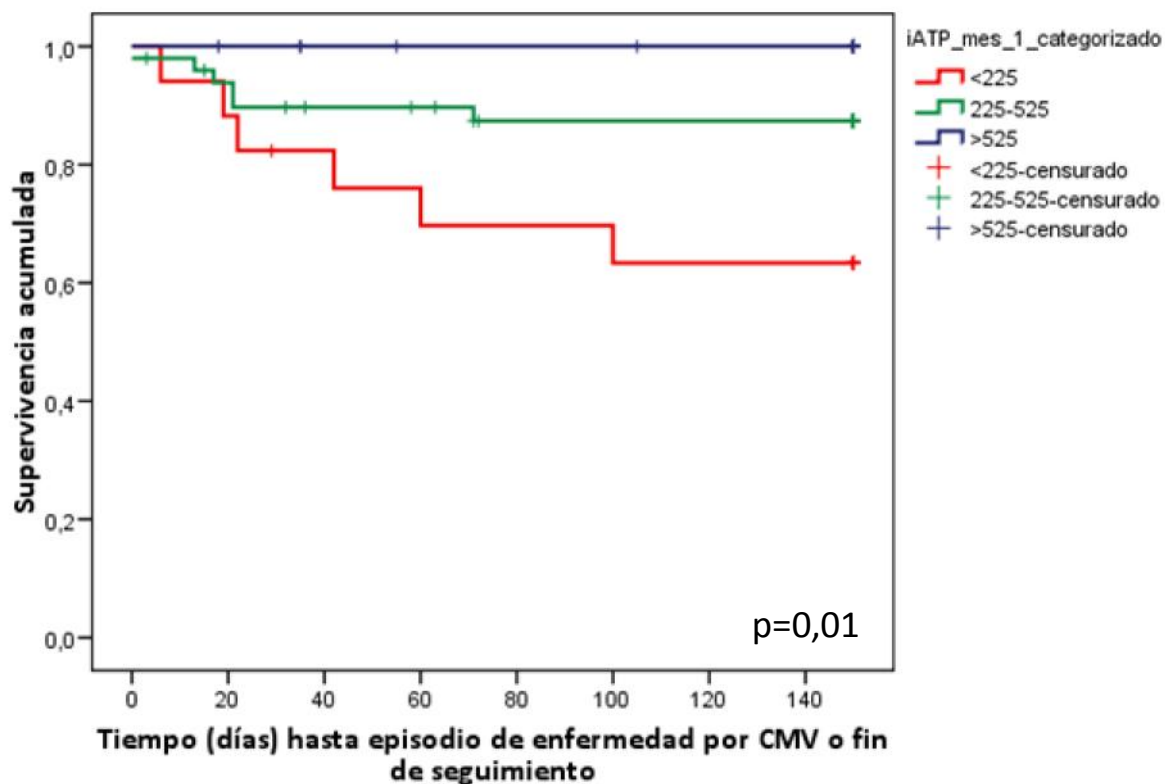
**Figura 25:** Curva de supervivencia libre de infección bacteriana en función del grado de respuesta inmune del mes 1 post-trasplante.



### 6.8.3 Supervivencia libre de enfermedad por CMV

Por el contrario, sí observamos diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de enfermedad por CMV a lo largo del periodo post-trasplante intermedio, con una menor supervivencia en aquellos pacientes con respuesta inmune débil según las concentraciones de iATP en el mes 1 (Log-Rank  $p=0,01$ ) (figura 26).

**Figura 26:** Curva de supervivencia libre de enfermedad por CMV en función del grado de respuesta inmune del mes 1 post-trasplante.



## 6.9 Validez de la determinación de la concentración de iATP como prueba predictora de infección en pacientes trasplantados renales

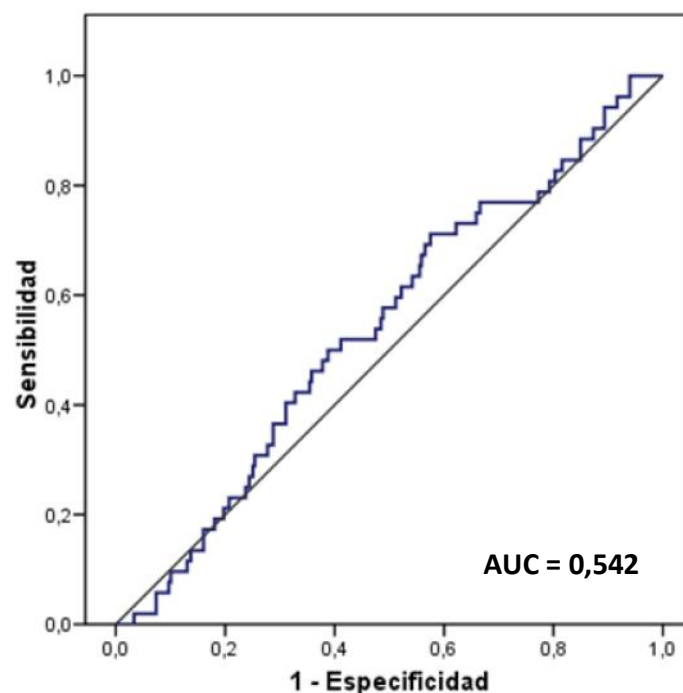
### 6.9.1 Concentración de iATP en la predicción de infección en pacientes trasplantados: curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)

Las curvas ROC para evaluar la capacidad de la concentración de iATP como prueba predictora de la aparición posterior de un evento infeccioso global, un episodio de infección bacteriana o bien un episodio de enfermedad por citomegalovirus mostraron que las concentraciones de iATP podían ayudar a

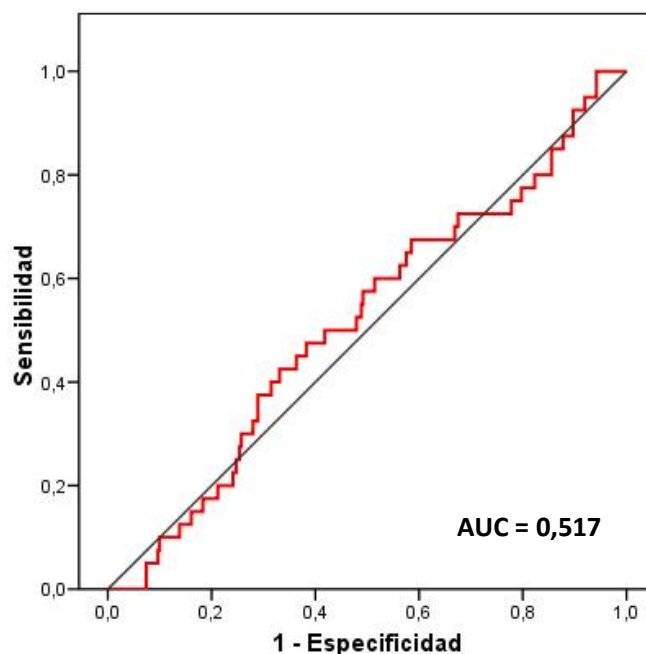
detectar aquellos pacientes con riesgo de desarrollar enfermedad por CMV y no así el resto de infecciones.

El área bajo la curva ROC (AUC-ROC) para la enfermedad por CMV fue de 0,707 (IC 95%: 0,611-0,804;  $p=0,003$ ) con una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las AUC-ROC para infección global [AUC-ROC: 0,543 (IC 95%: 0,468-0,619;  $p=0,272$ )] y frente al AUC-ROC para infección bacteriana [AUC-ROC: 0,517 (IC 95%: 0,423-0,611;  $p=0,732$ )], como se muestra en las figuras 27-29. Una vez más, no se consideró la cistitis susceptible de ser incluida en la categoría de infección bacteriana.

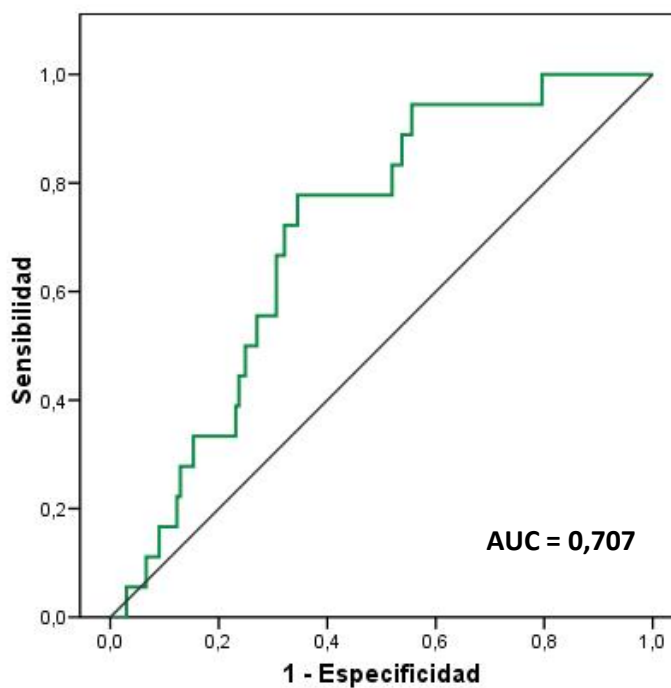
**Figura 27:** *Curvas ROC de los valores de iATP en la predicción de cualquier evento infeccioso en los primeros 45 días tras su determinación.*



**Figura 28:** Curva ROC de los valores de iATP en la predicción de eventos infecciosos bacterianos en los primeros 45 días tras su determinación.



**Figura 29:** Curva ROC de los valores de iATP en la predicción de enfermedad por CMV en los primeros 45 días tras su determinación.



### 6.9.2 Sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la concentración de iATP en la predicción de enfermedad por CMV

El valor de iATP óptimo para predecir el desarrollo de enfermedad por CMV después de la determinación, establecido a través del estadístico J de Youden, fue 265 ng/ml, con una sensibilidad de 72,22% (IC 95%: 46,53%- 90,2%) y una especificidad de 65,47% (IC95%: 60,09%-70,56%). Debido a la baja prevalencia de enfermedad por CMV en los pacientes trasplantados, que fue de 5,13%, el valor predictivo positivo fue de 10,16% (IC95%: 5,52%-16,74%). El valor predictivo negativo de 97,76% (IC95%: 94,84%-99,26%).

## 6.10 Parámetros que influyen en el desarrollo de enfermedad por CMV

### 6.10.1 Predictores del desarrollo de enfermedad por CMV: análisis univariante

Las variables que se asociaron con el desarrollo de enfermedad por CMV en el periodo post-trasplante intermedio fueron (tabla 15): la edad del receptor al trasplante (*Hazard ratio* [HR]: 1,11; IC95%: 1,045-1,179); el recuento total de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la determinación del primer mes (HR [por incremento unitario]: 0,995; IC95%: 0,990-0,999); y el valor de iATP en la determinación del mes 1 post-trasplante (HR [por incremento de 50 ng/ml en el valor de iATP]: 0,781; IC95% 0,659-0,926).

**Tabla 15:** *Predictores de enfermedad por CMV en el periodo intermedio post-trasplante (análisis univariante).*

Variable	HR	IC 95%	P
Edad del receptor en el momento del trasplante	1,11	1,045-1,179	0,001
Sexo (mujer)	1,682	0,542-5,220	0,369
Inducción con globulina antitimocítica	0,452	0,143-1,423	0,175
Missmatch serológico para CMV (D+/R-)	0,044	0,000-431,81	0,505
Profilaxis frente a CMV tras el trasplante	0,288	0,078-1,064	0,062
Valor IgG (mg/dl) en el primer mes post-trasplante	1,000*	0,998-1,002	0,874
Valor C3 (mg/dl) en el primer mes post-trasplante	0,977*	0,951-1,002	0,090
Valor C4 (mg/dl) en el primer mes post-trasplante	0,947*	0,870-1,031	0,207
Número de linfocitos/mm <sup>3</sup> totales en el primer mes post-trasplante	0,999*	0,998-1,000	0,088
Número de linfocitos TCD4 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup> en el primer mes post-trasplante	0,999*	0,997-1,001	0,310
Número de linfocitos TCD8 <sup>+</sup> /mm <sup>3</sup> en el primer mes post-trasplante	0,995*	0,990-0,999	0,039
Valor de iATP (ng/ml) en el primer mes post-trasplante	0,781**	0,659-0,926	0,004

\* HR por incremento unitario \*\* HR por incremento de 50 ng/ml en el valor de iATP

HR: *Hazard ratio*, IC: intervalo de confianza

### 6.10.2 Análisis multivariante de factores predictores del desarrollo de enfermedad por CMV

Después de ajustar por el *status* serológico D+/R- (*missmatch*), el uso de profilaxis frente a CMV, el haber recibido inducción con globulina antitimocítica y la edad del receptor en el momento del trasplante, la concentración de iATP en el primer mes se asoció de forma independiente con el desarrollo posterior de enfermedad por CMV en los cinco meses siguientes a dicho punto de monitorización, es decir en el periodo post-trasplante intermedio, con una *hazard ratio* de 0,816 (IC 95% 0,674-0,988) por cada incremento de 50 ng/ml en el valor de iATP del primer mes (tabla 16).

**Tabla 16:** Variables que mantienen su significación en el análisis multivariante\* de factores predictores del desarrollo de enfermedad por CMV a lo largo del periodo post-trasplante intermedio.

Variable	HR ajustada	IC 95%	P
Valor de iATP (ng/ml) primer mes post-trasplante	0,816**	0,674-0,988	0,037
Edad del receptor en momento del trasplante	1,099	1,019-1,185	0,014

\*Modelo ajustado por *missmatch* serológico para CMV, profilaxis frente a CMV tras el trasplante, inducción con globulina antitimocítica, edad del receptor y valor de iATP en el primer mes post-trasplante. Se muestran únicamente las variables que mantienen significación estadística.

\*\* HR por incremento de 50 ng/ml en el valor de iATP.

HR: *hazard ratio*. IC: intervalo de confianza.

## **7. DISCUSIÓN**



## 7. Discusión

Los pacientes portadores de un trasplante de órgano sólido presentan un mayor riesgo de desarrollar complicaciones infecciosas debido al uso de fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo del órgano implantado [4]. Para atender de forma óptima a estos pacientes es fundamental identificar a aquellos con mayor riesgo de desarrollar una infección, para así monitorizar más estrechamente sus niveles de inmunosupresión y utilizar estrategias adecuadas de profilaxis, con el fin de evitar la aparición de complicaciones infecciosas tras el trasplante [75].

Una de las estrategias de monitorización funcional de la respuesta inmune en receptores de trasplante de órgano sólido, que se ha valorado como indicador del estado neto de inmunosupresión, es la medición de la concentración intracelular de ATP en los linfocitos TCD4<sup>+</sup> de sangre periférica tras su estimulación inespecífica con fitohemaglutinina. El desarrollo del ensayo comercial Immuknow® (Cylex™/Viracor-IBT laboratories) ha facilitado el uso de este indicador gracias a la relativa facilidad para llevar a cabo su determinación.

Sin embargo, desde su aprobación por la FDA en 2002 [91], los múltiples estudios realizados para determinar el valor real de dicha estrategia en la predicción de complicaciones tras el trasplante han mostrado resultados contradictorios [110-112]. Este hecho ha dificultado la incorporación del ensayo como herramienta para ajustar de forma individualizada el tratamiento inmunosupresor en el paciente trasplantado, en función del riesgo neto de infección o de rechazo, y ofrecer así la posibilidad de un esquema de inmunosupresión “a la carta”.

El presente trabajo trata de salvar las limitaciones de diseños de estudios previos y consigue demostrar el valor de la medición de la concentración de iATP en la predicción de determinadas complicaciones post-trasplante.

### 7.1 Monitorización de los valores de iATP según un esquema preestablecido

Una de las limitaciones de los estudios previos es la indicación de la determinación de la concentración de iATP en el momento en el que el paciente desarrolla una complicación infecciosa [97, 99, 115]. Esta puede ser responsable de una modificación en el valor de iATP y, por tanto, condicionar un sesgo en la atribución de causalidad. Así, por ejemplo, en el caso de un evento infeccioso, el bajo valor de iATP no sería la causa de la aparición de una infección, sino la consecuencia de la misma [117].

A diferencia de varios de los estudios existentes en la literatura, el presente trabajo mide de forma regular los niveles de iATP, según un esquema de monitorización preestablecido, y no de manera puntual ni propiciada por el desarrollo de un episodio de infección o rechazo.

Los momentos establecidos para medir de forma reglada las concentraciones de iATP se eligieron según los puntos determinados por Fishman para dividir los periodos post-trasplante en precoz, intermedio y tardío [4]. Se realizó además una medición basal de iATP en el momento inmediatamente anterior al trasplante, para valorar así la respuesta inmune de la que partían los pacientes, y otra a mediados del periodo intermedio puesto que es un periodo prolongado, en el que tienen lugar la mayoría de eventos infecciosos oportunistas [140]

A la hora de analizar los eventos ocurridos y correlacionar el riesgo de su aparición con los valores de iATP previos, utilizamos dos esquemas distintos. Por un lado, se valoró la capacidad de predicción del iATP medido al inicio de cada una de las etapas post-trasplante sobre los eventos ocurridos a lo largo de ese periodo, sin tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la medición de iATP y la aparición del episodio de infección o rechazo. Por otro lado, se determinaron los eventos ocurridos en los 45 primeros días tras un punto de monitorización, independientemente del periodo post-trasplante en el que tuviera lugar dicha medición de iATP. Se eligió este rango de tiempo para que el valor de iATP determinado representara con mayor fiabilidad el “*status*” inmune del paciente en el momento del evento. Se tuvo en cuenta, además, que estudios previos

que utilizaban un rango de tiempo de 90 días tras la determinación de iATP no habían demostrado utilidad de los valores de iATP en la predicción del desarrollo posterior de eventos adversos [109].

Es posible que esta segunda aproximación sea más válida, puesto que el corto periodo de tiempo transcurrido entre la medición de iATP y el evento hace más probable que el grado real de inmunosupresión en el momento del cuadro de infección o rechazo sea el medido en el punto de monitorización, a diferencia de lo que ocurre en el primer esquema, donde no es posible asegurar que el iATP medido en el mes 1 sea exactamente el que el paciente tendría inmediatamente antes del evento, si éste ocurriera por ejemplo en el mes 5. De hecho, una limitación del estudio de Gupta *et al* [95] es precisamente este hecho, ya que incluye en su análisis episodios infecciosos que ocurren hasta seis meses después de la determinación de iATP. Por ello, la conclusión a la que llega, en la que deduce que la medición de iATP no es suficientemente sensible ni específica para ser usada clínicamente como herramienta en la predicción de infección en receptores de trasplante de órgano sólido, puede no ser completamente válida.

Otra ventaja de esta segunda estrategia de monitorización es que no tiene en cuenta los periodos post-trasplante, sino el grado de inmunosupresión como indicador fundamental del riesgo de infección. Este aspecto cobra mayor interés dado que algunos estudios han sugerido la revisión del esquema de infecciones en el post-trasplante postulado por Fishman [57]. Cada vez hay más constancia de que las infecciones en el periodo tardío, es decir más allá del sexto mes tras el trasplante, son también relevantes y producidas por agentes infecciosos similares a los que producen infección en los primeros seis meses [57, 141, 142].

## 7.2 Evolución de la respuesta inmune determinada a través de la medición de iATP a lo largo del tiempo tras el trasplante

En nuestra serie, los pacientes que se iban a someter a un trasplante renal tenían unos valores basales de iATP intermedios, es decir, entre 225-525 ng/ml según lo definido por Kowalski *et al*, con una media de 345,25 ng/ml (DE  $\pm$  149,39). Esta respuesta inmune disminuida con respecto a los individuos sanos que, como muestran estudios previos, tienen valores medios de iATP en torno a 430 ng/ml [94], podría justificarse por el hecho de que las toxinas urémicas (urea, la guanidina y el P-cresol, entre otras) acumuladas en la insuficiencia renal en estadios terminales [143, 144], pueden derivar en linfopenia, disminución del cociente  $CD4^+/CD8^+$  y cambios en la función de los linfocitos, lo que provoca una alteración de la inmunidad celular [145, 146].

Además, otros factores presentes en este grupo de pacientes pueden dar lugar a un mayor grado de disfunción inmune. Así, la hemodiálisis condiciona una menor respuesta proliferativa de los linfocitos T tras la estimulación con mitógenos debido a las altas concentraciones circulantes del receptor de IL-2 que determinan una supresión de la respuesta linfocitaria [147]. El envejecimiento [148-151], la diabetes *mellitus* [152] y el tratamiento inmunosupresor previo, por ejemplo en el caso de la nefropatía lúpica, también suponen un mayor grado de inmunodepresión. Todo esto justifica la tendencia observada en nuestra serie hacia valores basales de iATP más bajos, en el momento previo al trasplante, en aquellos receptores que presentaban estas características. No se llega a alcanzar la significación estadística probablemente por la distribución asimétrica de los distintos factores responsables de mayores grados de inmunosupresión entre los grupos.

Este cierto grado de inmunosupresión entre los pacientes con insuficiencia renal terminal determina que, ya antes del trasplante, este grupo presente un mayor riesgo de infecciones [153-155]; riesgo que se incrementará tras el trasplante, debido a una mayor disfunción de los linfocitos al ser sometidos a la acción de los fármacos inmunosupresores.

Como podemos observar en el presente estudio, tras el trasplante los valores de iATP disminuyeron con respecto a los basales, una disminución que fundamentalmente aparece a partir del primer mes, con mayor intensidad en el sexto, con un descenso medio en los valores de iATP de 73,557 (DE=174,09) ng/ml entre las determinaciones basal de iATP y la del sexto mes tras el trasplante. Esto concuerda con lo observado en el estudio realizado por Serban *et al* [156], en el que la función inmune celular determinada a través de los valores de iATP disminuye progresivamente entre el primero y quinto mes tras el trasplante, con valores más bajos entre el cuarto y quinto mes.

Pasados los primeros seis meses tras el trasplante, los valores de iATP aumentan progresivamente según muestra el estudio realizado por Vittoraki *et al* en receptores de trasplante renal que permanecieron estables, sin presentar episodios de rechazo ni de infección [157]. En el presente estudio no podemos realizar análisis en este sentido al no haber medido valores de iATP a partir del sexto mes post-trasplante.

### **7.3 Variables que influyen sobre el valor de iATP tras el trasplante**

El determinante fundamental de la disminución de iATP a lo largo del tiempo tras el trasplante es el tratamiento inmunosupresor de inducción, especialmente cuando el agente empleado para la misma es la globulina antitimocítica. Si bien en nuestro estudio no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de iATP entre aquellos que recibieron inducción y los que no, tanto en el primer mes, como en el tercero y el sexto, sí existía una tendencia clara hacia valores más bajos (unos 80 ng/ml menos) en el primer grupo.

Vittoraki *et al* [157] hallaron una correlación entre los valores de iATP y el protocolo de inmunosupresión de mantenimiento empleado, con valores de iATP significativamente inferiores entre los que recibieron tacrolimus frente a ciclosporina o más elevados en aquellos inmunosuprimidos con azatioprina frente al resto de protocolos de inmunosupresión ( $p < 0,001$ ). A partir de nuestro estudio no podemos inferir

conclusiones en cuanto a la influencia del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento, puesto que no se recogieron específicamente esos datos.

En cuanto a la influencia del número absoluto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sobre los valores de iATP, en nuestro trabajo encontramos una correlación positiva, pero débil. No hubo diferencias significativas, aunque sí una tendencia hacia valores medios más altos de iATP entre aquellos trasplantados con recuentos de linfocitos TCD4<sup>+</sup> por encima de 150/mm<sup>3</sup> con respecto a los que presentaban cifras menores a 150/mm<sup>3</sup>, tanto en el primero, como en el tercero y sexto mes tras el trasplante. Estos resultados contrastan con otros trabajos previos que han observado que los valores de iATP no se correlacionan con el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, por lo que concluyen que la funcionalidad de los linfocitos T es independiente de su número absoluto [64, 74]. Sin embargo, estudios como el de Fernández-Ruiz *et al* [48] y Calarota *et al* [85], han mostrado que bajos recuentos de CD4<sup>+</sup> se asocian con un riesgo de hasta 2,5 veces mayor de desarrollar infecciones oportunistas, lo que sugiere que un bajo número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se asocia a una menor capacidad en la defensa frente a la infección, probablemente por menor producción total de iATP como muestra nuestro estudio.

Otra variable que se analizó como posible modificador de los valores de iATP subsecuentes fue el rechazo agudo. Los episodios de rechazo agudo se han asociado frecuentemente con el desarrollo posterior de infección al utilizarse dosis adicionales de fármacos inmunosupresores para su tratamiento, como esteroides a altas dosis, gammaglobulina antitimocítica o anticuerpos antiCD30 (OKT3) entre otros. Algunos estudios previos han mostrado que el uso de altas dosis de metilprednisolona puede suponer un incremento de 1,29 veces del riesgo de infección [158]. Así, Dizdar *et al* [159] observaron que el desarrollo de neumonía en el post-trasplante se asociaba con una historia previa de rechazo agudo, con un incremento del riesgo de 11,3 veces respecto a aquellos trasplantados que no habían sufrido un episodio de rechazo. Igualmente, se ha visto un aumento en la incidencia de enfermedad por CMV tras un rechazo agudo, así Lee *et al* [160] observaron una incidencia de un 8% de enfermedad por CMV, fundamentalmente en forma de afectación gastrointestinal en pacientes con rechazo previo, frente a un 3% en aquellos sin él (p=0,04), por lo que concluyeron que

el rechazo agudo es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad invasiva por CMV con una OR de 2,81 (IC 95%: 1,08-7,29). Incluso, como observaron Pérez-Ordoño *et al*, parece que el riesgo de desarrollo de neumonía por *P. jirovecii* en el post-trasplante tardío puede incrementarse con el uso de agentes inmunosupresores más potentes para el tratamiento del rechazo [142].

Por todo ello, analizamos la influencia del rechazo agudo sobre los valores de iATP en el punto de monitorización siguiente a dicho episodio de rechazo, sin encontrar datos concluyentes sobre la repercusión de este hecho sobre las concentraciones de iATP. Así, aunque los valores de iATP eran algo menores entre los que habían presentado un episodio de rechazo previo a las monitorizaciones de los meses 1 y 3, las diferencias con los valores de aquellos que no habían presentado rechazo previo no eran significativas. Esta tendencia no se mantenía en el mes 6, pues los pacientes que habían presentado rechazo entre los meses 3 y 6 tenían cifras medias de iATP en el sexto mes superiores a las de aquellos sin rechazo en ese periodo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

También las infecciones podrían suponer una modificación en los valores posteriores de iATP. Estos cambios serían bien hacia la baja, puesto que la propia infección puede suponer una pérdida de la función efectora del linfocito T [117, 161], o bien hacia la alza, puesto que en casos de infecciones graves se reduce la inmunosupresión. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron que la infección bacteriana o la enfermedad por CMV en el periodo previo a la siguiente monitorización de iATP se correlacionaran con una modificación en los valores posteriores de iATP con respecto a los de aquellos pacientes que no desarrollaron dichos eventos.

Una posible limitación con la que nos encontramos a la hora de interpretar el porqué de la ausencia de influencia de la infección o el rechazo sobre los valores posteriores de iATP en nuestro estudio es la carencia de una información detallada sobre las modificaciones en los esquemas o dosis de fármacos inmunosupresores que, en función de los eventos ocurridos, se realizaron en cada momento a lo largo del post-trasplante. Esto es un factor importante puesto que el protocolo para ajustar el

régimen inmunosupresor en función de los eventos infecciosos o episodios de rechazo varía en cada centro e incluso en función de cada paciente [59].

## 7.4 Episodios infecciosos tras el trasplante

En nuestra serie de 100 trasplantados renales se produjeron un total de 166 episodios de infección en el periodo post-trasplante. Un 76,5% de las infecciones fueron de etiología bacteriana y un 18,1% viral. El citomegalovirus fue el agente etiológico más frecuente. No hubo ningún caso de infección por hongos filamentosos pero sí nueve episodios de infección por hongos levaduriformes.

### 7.4.1 Infecciones bacterianas

En cuanto a las infecciones bacterianas, más del 50% correspondían a infecciones del tracto urinario, lo que concuerda con lo descrito previamente [140, 162-164], donde se observa que la infección urinaria es la infección más común en pacientes trasplantados renales. Esta elevada incidencia se debe fundamentalmente a las alteraciones anatómicas y funcionales que tienen lugar tras la cirugía, como las complicaciones relacionadas con la anastomosis ureteral que pueden facilitar la obstrucción de las vías urinarias, o las alteraciones en el vaciado de la vejiga que facilitan el reflujo vesicoureteral y la sobreinfección del residuo postmiccional. Además, la colocación de catéteres urinarios para proteger la anastomosis quirúrgica también constituye un factor de riesgo importante en el desarrollo de estas infecciones.

Por otra parte, en cuanto a las infecciones bacterianas, cabe destacar en nuestra serie el desarrollo de 14 episodios de diarrea por *C.difficile* en el periodo post-trasplante, lo que supone un 8,4% de todos los eventos infecciosos. Según estudios previos en portadores de trasplante de órgano sólido, la incidencia de la diarrea por *C.difficile* se encuentra entre un 2 y un 8% [165-168]. El trasplante de órgano sólido es un factor de riesgo para el



desarrollo de este tipo de infección debido a los regímenes de inmunosupresión, la profilaxis antibiótica y la alta frecuencia de hospitalizaciones con estancia prolongada a las que se ven sometidos estos pacientes. Recientemente se ha descrito la hipogammaglobulinemia como un posible factor de riesgo añadido en el desarrollo de diarrea por *C.difficile* en receptores de trasplante renal [169] y cardíaco [80].

#### 7.4.2 Infecciones virales

Entre las infecciones virales, el citomegalovirus es uno de los principales agentes infecciosos que afectan a receptores de trasplante renal [170]. De los 30 episodios de infección viral observados a lo largo del seguimiento en nuestra serie, 22 fueron episodios de enfermedad por CMV, ocurridos en 19 pacientes. De ellos, 13 se manifestaron como síndrome viral y nueve como afectación de órgano diana, fundamentalmente colitis. Esto supone una incidencia en la cohorte de un 19%, superior a la descrita en la literatura, que se encuentra en torno a un 10% desde la implementación de las estrategias de profilaxis [171]. Esta mayor incidencia puede deberse a la laxitud de los criterios que definen el síndrome viral, sin existir una prueba diagnóstica certera que confirme al 100% dicho diagnóstico, lo que deja en manos del clínico la decisión final de considerar la probabilidad del diagnóstico.

La importancia de esta infección radica en que el CMV supone una causa importante de morbilidad y mortalidad, no sólo por los efectos directos de la enfermedad en sí, sino por los efectos indirectos del virus [58, 170, 172]. Así, el CMV aumenta el riesgo de aterosclerosis, estenosis de la arteria renal, diabetes *mellitus de novo* post-trasplante [173], nefropatía del injerto [174], desarrollo de rechazo agudo o crónico, e incluso se ha implicado en la patogenia del síndrome linfoproliferativo post-trasplante [175]. Por todo ello, los pacientes con antigenemia positiva de CMV presentan mayor incidencia de pérdida del injerto en comparación con aquellos receptores CMV negativos [176,177], y los pacientes con enfermedad por CMV tienen un

riesgo relativo de mortalidad global de 2,5, en relación con aquellos sin ella [178].

Dada la morbilidad y mortalidad que supone el CMV en receptores de trasplante de órgano sólido y que el riesgo de esta infección persiste pese al desarrollo de estrategias de profilaxis, es muy importante disponer de una técnica capaz de predecir el desarrollo de esta enfermedad en el tras el trasplante. De este modo se podría prevenir la infección con un ajuste dirigido e individualizado de las pautas de profilaxis. Estas técnicas cobrarían especial sentido en los periodos post-trasplante tardíos, cuando ya se ha suspendido la profilaxis [141, 179]. Es en estos periodos tardíos en los que se están describiendo cada vez con mayor frecuencia episodios de infección oportunista. En nuestro estudio un 18,2% de los episodios de enfermedad por CMV tuvieron lugar más allá del sexto mes, cuando los pacientes ya no recibían profilaxis ni se encontraban bajo un esquema de tratamiento anticipado.

#### **7.5. Concentración de iATP y desarrollo posterior de complicaciones infecciosas tras el trasplante renal**

Los estudios previos realizados en receptores de trasplante de órgano sólido han extraído conclusiones discordantes acerca de la utilidad de la medición de la concentración de iATP tras estimular los linfocitos TCD4<sup>+</sup> con un mitógeno inespecífico, a la hora de predecir el desarrollo posterior de una complicación infecciosa (tabla 5) [62-64, 90, 94-105, 108, 109, 114-116, 118-123, 126]. Estas discordancias se deben a que la mayoría de trabajos son retrospectivos, con un seguimiento limitado de los pacientes, heterogéneos en su diseño y, a menudo, con inclusión de receptores de trasplante de distintos órganos, cuyos protocolos de inmunosupresión y factores de riesgo para el desarrollo de un evento clínico adverso difieren notablemente.

Nuestro estudio, diseñado para tratar de salvar estas limitaciones, no encontró diferencias significativas en la concentración de iATP entre los trasplantados que

desarrollaron un evento infeccioso en los 45 días posteriores a la monitorización y los que no presentaron ningún evento, cuando se analizaron en conjunto todos los tipos de infecciones. Así el valor medio de iATP entre los primeros fue de 303,65 ng/ml (DE=146,45), no significativamente diferente al valor medio de 320,34 ng/ml (DE=158,31) de aquellos que no presentaron una infección.

Al repetir el análisis excluyendo como infección relacionada con la inmunosupresión la infección urinaria baja sintomática, tampoco se encontraron diferencias en los valores medios de iATP previos al desarrollo o no de un evento [304,14 ng/ml (DE=140,73) vs. 319,37 ng/ml (DE=158,69)]. Esta exclusión de la infección urinaria baja sintomática se fundamentó en el hecho ya indicado previamente de que su patogenia se debe más bien a alteraciones anatómicas y funcionales tras el trasplante y no tanto a la inmunosupresión [162-164].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los mecanismos de respuesta inmunológica frente a las infecciones no son iguales para todos los tipos de patógenos responsables. Así, es la infección viral la que desencadena fundamentalmente respuestas T celulares. Algunos autores como Batal [63], Gralla [119], Husain [121] o Mendler [123] han considerado este hecho al observar en sus estudios que los valores más bajos de iATP se encuentran en infecciones virales (CMV, virus BK o VHC) en las que la respuesta celular T es primordial para su control, en comparación con las de etiología bacteriana, donde las primeras líneas de la respuesta inmune son los componentes de la inmunidad innata incluyendo macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Esto concuerda con nuestros datos, pues la concentración previa de iATP fue significativamente menor en los pacientes que desarrollaron enfermedad por CMV en los primeros 45 días tras el punto de monitorización frente a aquellos con infecciones bacterianas [223,47 ng/ml (DE=100,43) vs 333,10 ng/ml (DE=150,40),  $p=0,006$ ] o aquellos que no presentaron ningún evento tras la determinación de iATP [223,47 ng/ml (DE=100,43) vs 320,34 ng/ml (DE=158,31),  $p=0,011$ ]. De hecho, el 55,6% de los pacientes que desarrollaron una enfermedad por CMV presentaban valores de iATP por debajo de 225 ng/ml y no hubo ningún trasplantado con valores de iATP superiores

a 525 ng/ml que desarrollara esta infección. Estas diferencias se mantuvieron al excluir la infección del tracto urinario inferior como infección bacteriana.

Además, observamos que la concentración de iATP del primer mes permitió predecir el desarrollo de enfermedad por CMV en los siguientes cinco meses tras el trasplante, pero no así el de infecciones bacterianas. Asimismo, destacaba la existencia de un gradiente en la distribución de episodios de enfermedad por CMV en función del grado de respuesta inmune, con mayor prevalencia de los mismos en el grupo de respuesta inmune débil (iATP<225 ng/ml), algo que no se observaba si se analizaban todos los eventos infecciosos globalmente o las infecciones bacterianas por separado.

En cuanto a la supervivencia libre de infección en función de los grados de respuesta inmune definidos por Kowalski *et al* [94], únicamente se encontraron diferencias en el caso de la enfermedad por CMV, con una menor supervivencia libre de enfermedad por CMV entre los trasplantados con valores de iATP menores de 225 ng/ml (Log rank:  $p=0,01$ ).

Esta capacidad predictiva del ensayo para la enfermedad por CMV se mantuvo después de ajustar por factores de confusión que suponen un incremento en el riesgo de desarrollarla, como son el *status* serológico D+/R- (*mismatch*), el uso de profilaxis frente a CMV y la edad del paciente. Así, en el análisis multivariante pudimos observar un efecto protector frente al desarrollo de enfermedad por CMV conforme aumentaba la concentración de iATP. El valor de iATP medido en el primer mes se asoció de forma independiente con el desarrollo posterior de enfermedad por CMV en los cinco meses siguientes a dicho punto de monitorización, con una *hazard ratio* de 0,816 (IC 95% 0,674-0,988) por cada incremento de 50 ng/ml en la concentración de iATP.

## **7.6 Validez de la medición de iATP producido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la predicción de enfermedad por CMV: sensibilidad y especificidad de la prueba**

Estudios previos muestran resultados variables en cuanto a la capacidad de la medición del iATP producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados para la predicción de eventos infecciosos, con áreas bajo la curva ROC que varían entre 0,670 y 0,991 [97, 104, 112, 110]. En nuestro estudio, la medición de iATP no tiene ningún valor en la predicción del desarrollo de eventos infecciosos analizados de forma global, ni en la predicción específica de infecciones bacterianas, con áreas bajo la curva ROC en torno a 0,5. Sin embargo, sí posee capacidad para discriminar entre aquellos receptores de órgano sólido que desarrollarán un episodio de enfermedad por CMV y los que no. Así, el valor del área bajo la curva ROC para predecir la aparición de enfermedad por CMV en función del valor de iATP en nuestro estudio fue de 0,71.

La mayoría de los trabajos que analizan la validez de la medición de iATP como prueba diagnóstica para la predicción de eventos infecciosos no tienen en cuenta los agentes etiológicos responsables ni los mecanismos de defensa frente a ellos, e incluyen cualquier tipo de infección en los análisis [64, 90, 97-105, 109, 115, 116]. La sensibilidad y especificidad de la prueba observada en dichos estudios es muy variable. Así, por ejemplo, en los estudios de Huskey *et al* [109] y Bhorade *et al* [99], la sensibilidad y especificidad de un valor de iATP inferior a 225 ng/ml fueron, respectivamente, de 21% y 83% en el primer estudio, frente a 93% y 38% en el segundo.

A su vez, Libri *et al* [118] analizaron únicamente las infecciones virales y observaron que valores de iATP menores o iguales a 225 ng/ml carecían de sensibilidad y especificidad (63,2% y 5,7% respectivamente) para el diagnóstico de infección por CMV, virus BK o virus herpes simple. Este estudio era pequeño y con un número de eventos clínicos escaso, lo que podría explicar las diferencias con los resultados observados en nuestro trabajo, en el que el valor óptimo de iATP para predecir la enfermedad por CMV en los primeros 45 días tras la medición de iATP fue de 265 ng/ml, con una

sensibilidad y especificidad de la prueba de 72,22% (IC 95%: 46,53% - 90,2%) y 65,47% (IC95%: 60,09% - 70,56%) respectivamente.

Debido a la baja incidencia de la enfermedad por CMV en receptores de trasplante renal, entre un 6 y un 9% desde la implementación de las estrategias de profilaxis [171], la prueba presenta muy bajo valor predictivo positivo [10,16% (IC95%: 5,52% - 16,74%)], aunque un alto valor predictivo negativo en torno al 98% [valor predictivo negativo de 97,76% (IC95%: 94,84% - 99,26%)]. Este valor predictivo negativo tan elevado permite concluir que con valores de iATP por encima de 265 ng/ml será muy improbable que un portador de trasplante renal desarrolle enfermedad por citomegalovirus.

### **7.7 Concentración de iATP y desarrollo posterior de episodios de rechazo agudo tras el trasplante renal**

El objetivo fundamental de nuestro trabajo no era evaluar la capacidad de la medición de iATP en la predicción de rechazo agudo. Sin embargo, se observó que la media de iATP previa a un episodio de rechazo ocurrido en los 45 días siguientes a un punto de monitorización era significativamente superior a la de aquellos pacientes que permanecían estables [415,81 ng/ml (DE=176,24) vs 320,34 ng/ml (DE=158,31),  $p=0,02$ ] o a la de aquellos que posteriormente presentaron cualquier evento infeccioso [415,81 ng/ml (DE=176,24) vs 303,65 ng/ml (DE=146,45),  $p=0,01$ ].

Además, el porcentaje de pacientes con respuesta inmune fuerte ( $>525$  ng/ml) era mayor entre los receptores que sufrieron un episodio de rechazo (31,3%) que entre aquellos que permanecieron estables (11,7%) o que desarrollaron algún tipo de infección (11,5%).

Estos resultados concuerdan con estudios previos, con mayor validez aún puesto que, al haber determinado la concentración de iATP en los 45 días previos a la aparición de un episodio de rechazo y no en el momento del evento, superan las limitaciones de

algunos de ellos [64, 98, 102, 105]. En este sentido, cabe destacar la utilidad de esta prueba para determinar el riesgo de desarrollar rechazo al detectar la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en sangre periférica incluso antes de que aparezcan en el injerto [180], lo que podría orientar el ajuste de las dosis de fármacos inmunosupresores para evitar un estado de infra-inmunosupresión [114].

### **7.8 Utilidad de la medición de la concentración de iATP en la práctica clínica**

La clave principal en el cuidado de los receptores de trasplante renal es conseguir un nivel de inmunosupresión adecuado. Por un lado, éste debe ser suficiente para evitar un rechazo pero, por otro, una inmunosupresión excesiva puede llevar a un incremento del riesgo de infecciones y neoplasias.

El test Immuknow® fue diseñado como una herramienta para analizar la reactividad global del sistema inmune de un individuo, basándose en el concepto de que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel fundamental en la respuesta inmune mediada por células y que la actividad metabólica de éstas células, determinada por la producción de ATP, puede representar su activación mejor que su proliferación clonal o la producción de citoquinas [181].

El presente trabajo, al tener en cuenta la importancia de la célula T en la defensa frente a la infección viral y no en otro tipo de infecciones controladas primariamente por leucocitos polimorfonucleares, demuestra la capacidad de la monitorización seriada de los valores de iATP a la hora de predecir el desarrollo de enfermedad por CMV. Puesto que esta patología supone una causa de morbi-mortalidad muy importante en los receptores de trasplante renal, además de los costes y toxicidades derivadas del uso de fármacos antivirales para su tratamiento y prevención, la medición seriada de la concentración de iATP puede ser una herramienta útil en el seguimiento de estos pacientes.

El alto valor predictivo negativo de la prueba para un punto de corte de iATP de 265 ng/ml para predecir el desarrollo de enfermedad por CMV en los siguientes 45 días, podría permitir replantearse la necesidad de mantener la profilaxis frente a CMV en aquellos pacientes con cifras de iATP por encima de ese valor, con la consecuente reducción de toxicidad asociada al valganciclovir y la disminución de costes derivados del uso de este fármaco o de la determinación de la carga viral de CMV en aquellos pacientes en los que se hubiera optado por la estrategia de tratamiento anticipado o *pre-emptive*.

En la actualidad se están desarrollando otras estrategias para determinar de forma específica el riesgo de infección por CMV en pacientes trasplantados, como son la cuantificación de interferón  $\gamma$  y por linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de CMV mediante la prueba comercial QuantiFERON®-CMV [182] o la tinción intracelular de citoquinas [183]. Ambas pruebas han mostrado capacidad para predecir una protección frente al desarrollo de infección por CMV en pacientes seropositivos sin profilaxis, con valores predictivos positivos en torno a 90% [184, 185]. Sin embargo, una ventaja de la medición de las concentraciones de iATP frente a estas técnicas es que su aplicación no se limita a la predicción de la infección por CMV, sino que evalúa globalmente la respuesta inmunológica y permite determinar también el riesgo de rechazo.

Hasta la fecha no existe un único método fiable para la monitorización del grado de inmunosupresión que permita identificar a los pacientes con mayor riesgo de sufrir un daño agudo o crónico del injerto [186]. Además, es arriesgado guiarse en las concentraciones de fármacos para ajustar el tratamiento inmunosupresor, puesto que los pacientes responden de forma individual a los mismos, por lo que modificar las dosis para situar al paciente dentro del rango terapéutico podría suponer el rechazo del injerto. De hecho, recientemente, la FDA ha subrayado que no existe un rango terapéutico óptimo para las concentraciones de ciclosporina y tacrolimus en sangre y, en consecuencia, no deberían emplearse de forma aislada para ajustar su dosificación [70]. Por lo tanto, es necesario buscar una herramienta que permita conocer la respuesta inmune global de cada receptor para realizar un ajuste individualizado del tratamiento inmunosupresor. La capacidad de medir el riesgo individual de cada



receptor de trasplante de órgano sólido es la clave para conseguir determinar la mínima dosis de fármacos inmunosupresores que consiga evitar un rechazo, a expensas de minimizar el riesgo de infección, neoplasias y toxicidad [74, 187].

Algunos estudios previos han sugerido la utilidad de la medición de iATP para guiar el ajuste del tratamiento inmunosupresor. Así, Zeevi *et al* [114], han postulado que, gracias a la medición de la concentración de iATP, los clínicos encargados de la asistencia de los receptores de trasplante intestinal podrían identificar a aquellos candidatos en los que se podría minimizar la dosis de fármacos inmunosupresores sin incrementar el riesgo de rechazo. En su estudio observaron que los valores de iATP en aquellos pacientes en los que había que aumentar la inmunosupresión por algún motivo eran significativamente mayores que en pacientes que no requerían dichos aumentos. Estos valores eran aún mayores en pacientes que requerían tratamiento con corticoides y OKT3, con valores de hasta 682 ng/ml en ese momento, frente a valores de 231 ng/ml en los que permanecían estables. Observaron, además, que en aquellos pacientes a los que se disminuyó empíricamente la dosis de inmunosupresores los valores posteriores de iATP se modificaron, con una concordancia entre valores más elevados y desarrollo de rechazo.

Resultados similares hallaron Millán *et al* [90] en receptores de trasplante hepático, en los que observaron que los niveles de iATP aumentaban en el subgrupo de pacientes en los que se redujo la inmunosupresión, como consecuencia de una reconstitución del sistema inmune. Asimismo, estos autores mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de iATP en receptores de trasplante renal que recibían una combinación de fármacos inmunosupresores en comparación con los que estaban en tratamiento con monoterapia (246 vs. 267 ng/ml), con lo que plantearon la posibilidad de un exceso innecesario de inmunosupresión en el primer grupo.

Estas observaciones se han confirmado en el ensayo clínico realizado por Ravaioli *et al* [129], en el que se determinó el valor de iATP de forma prospectiva, independientemente de un evento clínico y con toma de decisiones en función de los

resultados del mismo. En este estudio se distribuyó de forma aleatoria a 202 receptores de trasplante hepático a recibir un seguimiento post-trasplante según la práctica habitual del centro o bien a ser sometidos a mediciones seriadas de iATP (grupo de intervención) a intervalos regulares según un esquema preestablecido y modificar las dosis de tacrolimus en función de los valores de iATP, con una reducción de las dosis de FK en un 25% en pacientes si el iATP estaba por debajo de 130 ng/ml o un aumento de la dosis en un 25% si el iATP estaba por encima de 450 ng/ml. La incidencia de infecciones bacterianas y fúngicas en el grupo de intervención fue significativamente menor (42% vs. 54.9%,  $p<0,05$ ) y la supervivencia a un año significativamente mayor en este grupo frente a aquel en el que no se midieron los valores de iATP (95% vs. 82%,  $p<0,01$ ). Estos resultados demuestran que la determinación de la inmunidad celular a través de la medición del iATP es una herramienta eficaz para minimizar la inmunosupresión en pacientes portadores de trasplante hepático.

En cuanto a la periodicidad de la determinación de iATP, si bien los resultados de nuestro estudio demuestran que la medición de iATP en el mes 1 permite predecir el desarrollo de enfermedad por CMV en los cinco meses siguientes, dado el estado cambiante del sistema inmune a lo largo del tiempo [74], creemos más conveniente realizar determinaciones seriadas de iATP. En cuanto al intervalo de tiempo entre las determinaciones consideramos adecuado, de acuerdo a los resultados observados en nuestro estudio, una medición cada 45 días para que el valor de iATP refleje de forma más fiable el estado del sistema inmune en el momento del evento. En todo caso, para determinar la secuencia óptima de monitorización serán necesarios nuevos estudios, que incluyan también el análisis de la relación coste-beneficio.

### **7.9 Limitaciones del estudio.**

Nuestro estudio presenta algunos puntos fuertes notables. Entre ellos destacan su diseño prospectivo, con un esquema preestablecido de monitorización de las concentraciones de iATP de forma independiente a los eventos ocurridos y con

múltiples determinaciones en un mismo paciente a lo largo del tiempo; la inclusión de receptores de trasplante renal únicamente; una descripción exhaustiva del tipo de infección que ocurre en cada periodo post-trasplante; y una mediana de seguimiento de casi dos años (546 días) con escaso número de pérdidas. Además, los investigadores que realizaron la medición de iATP en el laboratorio de Inmunología y los que se encargaban de la atención clínica de los receptores de trasplante renal eran independientes y sin contacto entre ellos. Sólo tras haber registrado los eventos ocurridos para cada paciente, los investigadores que analizaron los datos dispusieron del resultado de las mediciones de iATP, lo que evitó la aparición de sesgos de observación [188].

No obstante, en nuestro estudio existen varias limitaciones. Por un lado, el número de pacientes incluidos en la serie no es muy grande y en consecuencia, el número de eventos tampoco, lo que hace perder potencia estadística. Si además tenemos en cuenta que la enfermedad por CMV es menos frecuente desde la implementación de estrategias de profilaxis, el valor predictivo positivo del ensayo Immuknow® para predecir el riesgo de desarrollar esta enfermedad se reduce de manera importante.

Por otra parte, el hecho de que en nuestro Centro no se realice una estrategia de tratamiento anticipado de la infección por CMV, supone una ausencia de monitorización reglada de la antigenemia o carga viral de CMV. Esto nos impide extraer conclusiones a cerca de la capacidad de la concentración de iATP para predecir la aparición de infección asintomática por CMV y sólo podemos analizar su valor a la hora de predecir el desarrollo de enfermedad por este virus.

Si bien uno de los principales puntos fuertes de nuestro estudio es la determinación de la concentración de iATP según un esquema de monitorización preestablecido, éste no fue perfecto en todos los casos, con ausencia de registro de alguno de los puntos de monitorización, lo que supone pérdida de datos. Además, a partir del sexto mes post-trasplante no se realizaron nuevas mediciones de iATP por lo que probablemente aquellos eventos que ocurren tardíamente no estén bien predichos por la

determinación del sexto mes, a excepción de aquellos que ocurren en los primeros 45 días tras dicha determinación.

Finalmente, al tratarse de un estudio observacional no podemos extraer conclusiones a cerca de la utilidad de la monitorización de las concentraciones de iATP en el ajuste del tratamiento inmunosupresor.

### 7.10 Estudios futuros

Los resultados observados en el presente estudio abren la puerta para la realización de ensayos clínicos que comprueben la seguridad de la retirada de la profilaxis frente a citomegalovirus en pacientes con valores de iATP por encima de 265 ng/ml, con un análisis cuidadoso del coste-beneficio.

Además, sería interesante realizar un ensayo similar al de Ravaioli *et al* [129] en receptores de trasplante renal, para comprobar la utilidad de la determinación de la inmunidad mediada por células a través de la medición de los valores de iATP en el ajuste de la inmunosupresión. Con ello se podrían minimizar las dosis de fármacos inmunosupresores para reducir la incidencia de infecciones sin incrementar el riesgo de rechazo. Serían convenientes seguimientos prolongados que permitieran analizar también la reducción de la toxicidad derivada del uso de fármacos inmunosupresores tanto sobre la función renal, como sus efectos adversos cardiovasculares o incluso neoplásicos [189, 190], al reducir la dosis de los mismos con la ayuda de la monitorización de la inmunidad celular.

## **8. COROLARIO**

## 8. Corolario

- La medición periódica de la concentración de iATP producido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina en receptores de trasplante renal predice el desarrollo de infecciones para cuya protección es determinante la inmunidad celular, concretamente la enfermedad por citomegalovirus.
- La medición de la concentración de iATP por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina en receptores de trasplante renal no permite predecir el desarrollo de infecciones por bacterias en las que la inmunidad celular no juega un papel preponderante.
- No es posible extraer conclusiones sobre la capacidad de la prueba para predecir el desarrollo de infecciones por hongos filamentosos o por micobacterias, dada la ausencia de estos eventos en la presente cohorte.
- La prueba demostró su máxima utilidad en la predicción de enfermedad por citomegalovirus en los 45 días posteriores a la determinación de la concentración de iATP producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina.
- En comparación con las determinaciones realizadas en otros momentos del post-trasplante, la medición de la concentración de iATP producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina realizada un mes después del trasplante renal es la que presentó mayor capacidad para predecir el desarrollo posterior de enfermedad por citomegalovirus. Esta capacidad de predicción fue independiente del *status* serológico D+/R-, del empleo de profilaxis antiviral y de la administración de globulina antitimocítica como tratamiento de inducción en el post-trasplante inmediato.
- Sería de interés el desarrollo de futuros estudios para determinar la utilidad de la medición de iATP como guía para el ajuste del tratamiento inmunosupresor de forma individualizada. De este modo se podría minimizar su utilización hasta un

punto de equilibrio en el que existiera menos riesgo de toxicidad farmacológica y de infecciones, sin aumentar el riesgo de aparición de un rechazo del injerto renal.

- El valor de iATP de 265 ng/ml presentó un alto valor predictivo negativo para el riesgo de desarrollar enfermedad por citomegalovirus en los 45 días posteriores a la determinación. Sería interesante la realización de estudios futuros que valoraran la utilidad de esta prueba en el ajuste de la profilaxis antiviral frente a esta infección, con retirada de la misma en aquellos receptores de trasplante renal con valores de iATP superiores a 265 ng/ml.

## **9. CONCLUSIÓN**



## 9. Conclusión

En receptores de trasplante renal, la determinación periódica de la concentración intracelular de ATP producida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con fitohemaglutinina predice el desarrollo de infecciones para cuya defensa es esencial la inmunidad celular, concretamente la enfermedad por citomegalovirus, pero no es capaz de predecir el desarrollo de otro tipo de infecciones.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## 10. Bibliografía

1. Registro español de enfermos renales. Informe de diálisis y trasplante. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/REERCongSEN2012.pdf>.
2. Hernández D, Moreso F. Has patient survival following renal transplantation improved in the era of modern immunosuppression? *Nefrología*. 2013; 33: 171-88.
3. Guild WR, Harrison JH, Merrill JP, Murray J. Successful homotransplantations of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1955-1956; 67: 167-73.
4. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2601-14.
5. Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *Am J Transplant*. 2004; 4: 384-9.
6. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (2 Suppl 2): S24–S32.
7. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343: 37-49.
8. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343: 108-17.
9. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 1–5.
10. Veldhoen M. The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21: 606-11.
11. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010; 129: 311-21.
12. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol*. 2010; 7: 164-74.
13. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res*. 2009; 19: 399-411.

14. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. El complejo mayor de histocompatibilidad. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2ª edición. Madrid: Mc Graw-Hill, Interamericana; 1996. p.106-26.
15. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología celular y molecular. 2ª edición. Madrid: Mc Graw-Hill, Interamericana; 1996. p.357-76.
16. LeibundGut-Landmann S, Wüthrich M, Hohl TM. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24: 449-58.
17. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009; 126: 177-85.
18. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol*. 2013; 190: 521-5.
19. Gaffen SL, Hernández-Santos N, Peterson AC. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol Res*. 2011; 50: 181-7.
20. Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11: 385-402.
21. Matzinger P, Bevan MJ. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigen? *Cell Immunol*. 1977; 29: 1-5.
22. Vella JP, Vos L, Carpenter CB, Sayegh MH. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation*. 1997; 64: 1823-8.
23. Wang D, Matsumoto R, You Y, Che T, Lin XY, Gaffen SL, et al. CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 164-71.
24. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2715-29.
25. Fishman JA. AST Infectious Diseases Community of Practice. Introduction: infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 Suppl 4: S3-6.
26. Opelz G, Döhler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant*. 2004; 4: 222-30.

27. Cuervas Mons V. Medicamentos inmunosupresores. En: Aguado JM, editor. Infecciones en pacientes trasplantados. 2ª ed. Madrid: Elsevier España SA; 2004. p. 90-112.
28. Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation. 1998; 65: 1450-4.
29. Margreiter R. European Tacrolimus vs Ciclosporin Microemulsion Renal Transplantation Study Group. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. Lancet. 2002; 359: 741-6.
30. Sonoda T, Takahara S, Takahashi K, Uchida K, Ohshima S, Toma H, et al. Outcome of 3 years of immunosuppression with tacrolimus in more than 1,000 renal transplant recipients in japan. Transplantation. 2003; 75: 199-204.
31. Krämer BK, Montagnino G, Del Castillo D, Margreiter R, Sperschneider H, Olbricht CJ, et al. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin A microemulsion in renal transplantation: 2 year follow-up results. Nephrol Dial Transplant. 2005; 20: 968-73.
32. Morales JM, Campistol JM, Kreis H, Mourad G, Eris J, Schena FP, et al. Sirolimus-based therapy with or without cyclosporine: long-term follow-up in renal transplant patients. Transplant Proc. 2005; 37: 693-6.
33. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG, O'Sullivan EJ, Johnson MR, Heroux AL, et al. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. N Engl J Med. 1990; 323: 1723-8.
34. Whiting JF, Rossi SJ, Hanto DW. Infectious complications after OKT3 induction in liver transplantation. Liver Transpl Surg 1997; 3: 563-70.
35. Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. Toxicology 1995; 105: 23-9.
36. Webster AC, Playford EG, Higgins G, Chapman JR, Craig JC. Interleukin 2 receptor antagonists for renal transplant recipients: a meta-analysis of randomized trials. Transplantation. 2004; 77: 166-76.

37. Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Carreno MR, Cirocco RE, Mathew JM, et al. A randomized trial of three renal transplant induction antibodies: early comparison of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroid dosing, and newer immune-monitoring. *Transplantation*. 2005; 80: 457-65.
38. Castellano G, Manzano ML. Tratamiento y profilaxis de la hepatitis B en pacientes inmunosuprimidos. *Gastroenterol hepatol* 2012; 35: 1-19.
39. Danovitch GM. Choice of immunosuppressive drugs and individualization of immunosuppressive therapy for kidney transplant patients. *Transplant Proc* 1999; 31: 2S-6S.
40. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Thymoglobulin Induction Study Group. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1967-77.
41. Lefaucheur C, Nochy D, Glotz D. Antibody-mediated acute rejection. *Nephrol Ther*. 2008; 4 Suppl 3: S188-91.
42. Webster A, Pankhurst T, Rinaldi F, Chapman JR, Craig JC. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 2: CD004756.
43. Hostetter TH. Chronic transplant rejection. *Kidney Int*. 1994; 46: 266-79.
44. Van den Berg AP, Klompmaker IJ, Haagsma EB, Peeters PM, Meerman L, Verwer R, et al. Evidence for an increased rate of bacterial infections in liver transplant patients with cytomegalovirus infection. *Clin Transplant*. 1996; 10: 224-31.
45. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 772-86.
46. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Morales JM, García-Reyne A, San Juan R, et al. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant*. 2013; 13: 685-94.
47. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Lora-Pablos D, García-Reyne A, González E, et al. Monitoring of immunoglobulin levels identifies kidney transplant recipients at high risk of infection. *Am J Transplant*. 2012; 12: 2763-73.

48. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Allende LM, Andrés A, García-Reyne A, Lumbreras C, et al. Kinetics of peripheral blood lymphocyte subpopulations predicts the occurrence of opportunistic infection after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014; 27: 674-85.
49. Mawhorter S, Yamani MH. Hypogammaglobulinemia and infection risk in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13: 581-5.
50. Gavdalá J, Pahissa A. Factores de riesgo y cronología de la infección en el trasplante de órgano sólido. En: Aguado JM, editor. *Infecciones en pacientes trasplantados*. 2 ed. Madrid: Elsevier España S.A; 2004. p. 152-163.
51. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24: 273-83.
52. Rubin RH. Infectious disease complications of renal transplantation. *Kidney Int*. 1993; 44: 221-36.
53. Schafer IJ, Miller R, Ströher U, Knust B, Nichol ST, Rollin PE. Notes from the field: a cluster of lymphocytic choriomeningitis virus infections transmitted through organ transplantation-Iowa, 2013. *Am J Transplant*. 2014; 14: 1459.
54. Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, Sutker WL, Ksiazek TG, et al. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1103-11.
55. Green M, Michaels MG. Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant*. 2013; 13 Suppl 3: S41-54.
56. Nindl I, Rösl F. Molecular concepts of virus infections causing skin cancer in organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008; 8: 2199-204.
57. Garrido RS, Aguado JM, Díaz-Pedroche C, Len O, Montejo M, Moreno A, et al. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. *Transplantation*. 2006; 82: 1457-62.
58. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013; 96: 333-60.

59. Kasiske BL, Zeier MG, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, Green MD, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 Suppl 3: S1-155.
60. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2001; 41: 542-51.
61. Fleming JN, Weimert NA. Novel strategies for immune monitoring in kidney transplant recipients. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010; 17: e63-77.
62. Xue F, Zhang J, Han L, Li Q, Xu N, Zhou T, et al. Immune cell functional assay in monitoring of adult liver transplantation recipients with infection. *Transplantation*. 2010; 89: 620-6.
63. Batal I, Zeevi A, Heider A, Girnita A, Basu A, Tan H, et al. Measurements of global cell-mediated immunity in renal transplant recipients with BK virus reactivation. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129: 587-91.
64. Israeli M, Ben-Gal T, Yaari V, Valdman A, Matz I, Medalion B, et al. Individualized immune monitoring of cardiac transplant recipients by noninvasive longitudinal cellular immunity tests. *Transplantation*. 2010; 89: 968-76.
65. Rovira P, Mascarell L, Truffa-Bachi P. The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation. *Curr Med Chem*. 2000; 7: 673-92.
66. Perico N, Ruggenenti P, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Valente U, Salvadori M, et al. In renal transplantation blood cyclosporine levels soon after surgery act as a major determinant of rejection: insights from the MY.S.S. trial. *Kidney Int*. 2004; 65: 1084-90.
67. Sommerer C, Konstandin M, Dengler T, Schmidt J, Meuer S, Zeier M, et al. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine A in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies. *Transplantation*. 2006; 82: 1280-5.
68. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Lee J, Tromp JV, et al. Mycophenolic acid 12-h trough level monitoring in renal transplantation: association with acute rejection and toxicity. *Am J Transplant*. 2006; 6: 121-8.



69. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, et al. Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit.* 1995; 17: 606-14.
70. USDHHS. Class II Special Controls Guidance Document: Cyclosporine and Tacrolimus Assays; Draft guidance for Industry and FDA. 2002. p.1–18 U.S.D.H.H.S., FDA, Division of Clinical Laboratory Devices.
71. Rodrigo E, Arias M. A practical approach to immune monitoring in kidney transplantation. *Minerva Urol Nefrol.* 2007; 59: 337-52.
72. Fernández-Ruiz M, Kumar D, Humar A. Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin Transl Immunology.* 2014; 3: e12.
73. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia. Elsevier Saunders 2012.
74. López-Hoyos M, Rodrigo E, Arias M. The usefulness of intracellular adenosine-5'-triphosphate measurement in CD4+ cells in renal transplant. *Nefrologia.* 2013; 33: 381-8
75. Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res.* 2005; 4: 1086-97.
76. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM, Sandkovsky U. What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant.* 2013; 13: 2601-10.
77. Keven K, Sahin M, Kutlay S, Sengul S, Erturk S, Ersoz S, et al. Immunoglobulin deficiency in kidney allograft recipients: comparative effects of mycophenolate mofetil and azathioprine. *Transpl Infect Dis.* 2003; 5: 181-6.
78. Ganschow R, Lyons M, Kemper MJ, Burdelski M. B-cell dysfunction and depletion using mycophenolate mofetil in a pediatric combined liver and kidney graft recipient. *Pediatr Transplant.* 2001; 5: 60-3.
79. Yamani MH, Avery RK, Mawhorter SD, Young JB, Ratliff NB, Hobbs RE, et al. Hypogammaglobulinemia following cardiac transplantation: a link between rejection and infection. *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20: 425-30.

80. Muñoz P, Giannella M, Alcalá L, Sarmiento E, Fernández Yáñez J, Palomo J, et al. Clostridium difficile-associated diarrhea in heart transplant recipients: is hypogammaglobulinemia the answer? J Heart Lung Transplant. 2007; 26: 907-14.
81. Yamani MH, Avery R, Mawhorter SD, McNeill A, Cook D, Ratliff NB, et al. The impact of CytoGam on cardiac transplant recipients with moderate hypogammaglobulinemia: a randomized single-center study. J Heart Lung Transplant. 2005; 24: 1766-9.
82. Carbone J, Sarmiento E, Del Pozo N, Rodríguez-Molina JJ, Navarro J, Fernández-Yáñez J, et al. Restoration of humoral immunity after intravenous immunoglobulin replacement therapy in heart recipients with post-transplant antibody deficiency and severe infections. Clin Transplant. 2012; 26: E277-8.
83. Carbone J, Micheloud D, Salcedo M, Rincon D, Bañares R, Clemente G, et al. Humoral and cellular immune monitoring might be useful to identify liver transplant recipients at risk for development of infection. Transpl Infect Dis. 2008; 10: 396-402.
84. Sarmiento E, del Pozo N, Gallego A, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Villa A, et al. Decreased levels of serum complement C3 and natural killer cells add to the predictive value of total immunoglobulin G for severe infection in heart transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2012; 14: 526-39.
85. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, Chiesa A, Comolli G, Sarchi E, et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in heart and kidney transplant recipients. Transplantation. 2012; 93: 112-9.
86. De Castro N, Xu F, Porcher R, Pavie J, Molina JM, Peraldi MN. Pneumocystis jirovecii pneumonia in renal transplant recipients occurring after discontinuation of prophylaxis: a case-control study. Clin Microbiol Infect. 2010; 16: 1375-7.
87. Struijk GH, Gijzen AF, Yong SL, Zwinderman AH, Geerlings SE, Lettinga KD, et al. Risk of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients long after renal transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26: 3391-8.

88. Brunot V, Pernin V, Chartier C, Garrigue V, Vetromile F, Szwarc I, et al. An epidemic of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a renal transplantation center: role of T-cell lymphopenia. *Transplant Proc.* 2012; 44: 2818-20.
89. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis.* 2012; 55: 1678-89.
90. Millán O, Sánchez-Fueyo A, Rimola A, Guillen D, Hidalgo S, Benitez C, et al. Is the intracellular ATP concentration of CD4<sup>+</sup> T-Cells a predictive biomarker of immune status in stable transplant recipients? *Transplantation.* 2009; 88 (3 Suppl): S78-84.
91. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Cylex Immune Cell Function Assay. 510(k) Summary. K013169. Rockville, MD: FDA; April 2, 2002. Disponible en: <http://www.fda.gov/cdrh/pdf/k013169.pdf>.
92. Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today.* 2000; 21: 192-9.
93. Suviolahti E, Petrosyan A, Mirocha J, Ge S, Karasyov A, Thomas D, et al. Significant reduction of ATP production in PHA-activated CD4<sup>+</sup> cells in 1-day-old blood from transplant patients. *Transplantation.* 2012; 94: 1243-9.
94. Kowalski R, Post D, Schneider MC, Britz J, Thomas J, Deierhoi M, et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clin Transplant.* 2003; 17: 77-88.
95. Gupta S, Mitchell JD, Markham DW, Mammen PP, Patel PC, Kaiser PA, et al. Utility of the Cylex assay in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2008; 27: 817-22.
96. Zhou T, Xue F, Han LZ, Xi ZF, Li QG, Xu N, et al. Invasive fungal infection after liver transplantation: risk factors and significance of immune cell function monitoring. *J Dig Dis.* 2011; 12: 467-75.
97. Sánchez-Velasco P, Rodrigo E, Valero R, Ruiz JC, Fernández-Fresnedo G, López-Hoyos M, et al. Intracellular ATP concentrations of CD4 cells in kidney transplant patients with and without infection. *Clin Transplant.* 2008; 22: 55-60.
98. Pérez-Flores I, Sánchez-Fructuoso A, Santiago JL, Fernández-Arquero M, Calvo N, de la Concha EG, et al. Intracellular ATP levels in CD4<sup>+</sup> lymphocytes are a risk

- marker of rejection and infection in renal graft recipients. *Transplant Proc.* 2009; 41: 2106-8.
99. Bhorade SM, Janata K, Vigneswaran WT, Alex CG, Garrity ER. Cylex ImmuKnow assay levels are lower in lung transplant recipients with infection. *J Heart Lung Transplant.* 2008; 27: 990-4.
  100. Xue F, Zhang J, Han L, Li Q, Xu N, Zhou T, et al. Immune cell functional assay in monitoring of adult liver transplantation recipients with infection. *Transplantation.* 2010; 89: 620-6.
  101. Kobashigawa JA, Kiyosaki KK, Patel JK, Kittleson MM, Kubak BM, Davis SN, et al. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29: 504-8.
  102. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation.* 2006; 82: 663-8.
  103. Cadillo-Chávez R, de Echegaray S, Santiago-Delpín EA, Rodríguez-Trinidad AT, Camacho-Carrazo B, Alfaro T, et al. Assessing the risk of infection and rejection in Hispanic renal transplant recipients by means of an adenosine triphosphate release assay. *Transplant Proc.* 2006; 38: 918-20.
  104. Zhou H, Wu Z, Ma L, Wu W, Yang S, Wang Q, et al. Assessing immunologic function through CD4 T-lymphocyte adenosine triphosphate levels by ImmuKnow assay in Chinese patients following renal transplantation. *Transplant Proc.* 2011; 43: 2574-8.
  105. He J, Li Y, Zhang H, Wei X, Zheng H, Xu C, et al. Immune function assay (ImmuKnow) as a predictor of allograft rejection and infection in kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2013; 27: E351-8.
  106. Myslik F, House AA, Yanko D, Warren J, Caumartin Y, Rehman F, et al. Preoperative Cylex assay predicts rejection risk in patients with kidney transplant. *Clin Transplant.* 2014; 28: 606-10.
  107. Reinsmoen NL, Cornett KM, Kloehn R, Burnette AD, McHugh L, Flewellen BK, et al. Pretransplant donor-specific and non-specific immune parameters associated with early acute rejection. *Transplantation.* 2008; 85: 462-70.

108. De Paolis P, Favarò A, Piola A, Martini F, Cristiana G, Agrati C, Iappelli M, et al. "Immuknow" to measurement of cell-mediated immunity in renal transplant recipients undergoing short-term evaluation. *Transplant Proc.* 2011; 43: 1013-6.
109. Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 423-9.
110. Ling X, Xiong J, Liang W, Schroder PM, Wu L, Ju W, et al. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation.* 2012; 93: 737-43.
111. Wang Z, Liu X, Lu P, Han Z, Tao J, Wang J, et al. Performance of the ImmuKnow assay in differentiating infection and acute rejection after kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplant Proc.* 2014; 46: 3343-51.
112. Rodrigo E, López-Hoyos M, Corral M, Fábrega E, Fernández-Fresnedo G, San Segundo D, et al. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl.* 2012; 18: 1245-53.
113. Sood S, Testro AG. Immune monitoring post liver transplant. *World J Transplant.* 2014; 4: 30-9.
114. Zeevi A, Husain S, Spichty KJ, Raza K, Woodcock JB, Zaldonis D, et al. Recovery of functional memory T cells in lung transplant recipients following induction therapy with alemtuzumab. *Am J Transplant.* 2007; 7: 471-5.
115. Thai NL, Blisard D, Tom K, Basu A, Smetanka C, Tan H, et al. Pancreas transplantation under alemtuzumab (Campath-1H) and tacrolimus: Correlation between low T-cell responses and infection.. *Transplantation.* 2006; 82: 1649-52.
116. Valero R, Sánchez-Velasco P, Rodrigo E, Ruiz JC, Leyva F, Arias M. Assesment of infection in kidney transplant by measuring the concentration of ATP from CD4 cells following stimulation by Cylex. En *Kidney transplantation: rejection and immunosuppression: World Transplant Congress. Abstract 1244.* p. 486-7.
117. Hosking MMP, Flynn CT, Botten J, Whitton JL. CD8+ memory T cells appear exhausted within hours of acute virus infection. *J Immunol* 2013; 191: 4211-22.

118. Libri I, Gnappi E, Zanelli P, Reina M, Giuliodori S, Vaglio A, et al. Trends in immune cell function assay and donor-specific HLA antibodies in kidney transplantation: A 3-year prospective study. *Am J Transplant*. 2013; 13: 3215-22.
119. Gralla J, Huskey J, Wiseman AC. Trends in immune function assay (ImmuKnow; Cylex™) results in the first year post-transplant and relationship to BK virus infection. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 2565-70.
120. Gautam A, Fischer SA, Yango AF, Gohh RY, Morrissey PE, Monaco AP. Cell mediated immunity (CMI) and post transplant viral infections--role of a functional immune assay to titrate immunosuppression. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6: 2023-6.
121. Husain S, Raza K, Pilewski JM, Zaldonis D, Crespo M, Toyoda Y, et al. Experience with immune monitoring in lung transplant recipients: correlation of low immune function with infection. *Transplantation*. 2009; 87: 1852-7.
122. Helanterä I, Koskinen P. Association of immune cell function assay with protocol biopsy findings and viral infections in well matched kidney transplant recipients. *Clin Nephrol*. 2010; 74: 123-31.
123. Mendler M, Kwok H, Franco E, Baron P, Weissman J, Ojogho O. Monitoring peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in a liver transplant cohort: insight into the interplay between hepatitis C virus infection and cellular immunity. *Liver Transpl*. 2008; 14: 1313-22.
124. Thimme R, Neumann-Haefelin C, Boettler T, Blum HE. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. *Biol Chem*. 2008; 389: 457-67.
125. Alkhouri N, Hanouneh IA, Lopez R, Zein NN. Monitoring peripheral blood CD4+ adenosine triphosphate activity in recurrent hepatitis C and its correlation to fibrosis progression. *Liver Transpl*. 2010; 16: 155-62.
126. Quaglia M, Cena T, Fenoglio R, Musetti C, Cagna D, Radin E, et al. Immune function assay (immunknow) drop over first 6 months after renal transplant: a predictor of opportunistic viral infections? *Transplant Proc*. 2014; 46: 2220-3.
127. Berglund D, Bengtsson M, Biglarnia A, Berglund E, Yamamoto S, von Zur-Mühlen B, et al. Screening of mortality in transplant patients using an assay for immune function. *Transpl Immunol*. 2011; 24: 246-50.

128. Britz J, Post D, Hawkins D, Kowalski R. Extremely low immune function is associated with increased risk of mortality in solid organ transplant recipients. Paper presented at: Nantes Actualites Transplantation. France: Nantes; 2007.
129. Ravaioli M, Neri F, Lazzarotto T, Bertuzzo VR, Di Gioia P, Stacchini G, et al. Immunosuppression Modifications Based on an Immune Response Assay: Results of a Randomized, Controlled Trial. Transplantation. 2015 [Epub ahead of print].
130. Memoria de actividad 2013. Organización Nacional de Trasplante. Disponible en: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Memoria%20trasplante%20renal%202013.pdf>.
131. Ruiz P, Borowitz MJ, Tilahun H, Clarke T, Keyer L, Coxey A. BD Biosciences Application Note (Sept 2007). Productivity and efficiency of 6-color BD Multitest and BD Trucount technologies. Disponible en: <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=17742> (accessed November 13, 2014).
132. Whicher JT, Warren C, Chambers RE. Immunochemical assays for immunoglobulins. Ann Clin Biochem. 1984; 21(Pt 2):78-91.
133. Andrés A, Polanco N, González E. Optimización de la función renal con inhibidores de mTOR. Nefrología Sup Ext 2011; 2: 10-8.
134. Humar A, Michaels M; AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. Am J Transplant. 2006; 6: 262-74.
135. Torre-Cisneros J, Doblas A, Aguado JM, San Juan R, Blanes M, Montejo M, et al. Tuberculosis after solid-organ transplant: incidence, risk factors, and clinical characteristics in the RESITRA (Spanish Network of Infection in Transplantation) cohort. Clin Infect Dis 2009; 48: 1657-65.
136. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 2008; 46:1813-21.

137. Ljungman P, Stanley PA. Workshop on cytomegalovirus disease; definitions, clinical severity scores and new syndromes. *Scand J Infect Dis* 1995; 99(Suppl.): 87–89.
138. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 1094-7.
139. European Expert Group on Renal Transplantation (EBPG); European Renal Association (ERA-EDTA); European Society for Organ Transplantation (ESOT). European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (part 1). *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 (Suppl 7): 1-85.
140. Rubin RH. Infection in the organ transplant recipient. In: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host*. 4th edition. NewYork: KluwerAcademic/Plenum Publishers; 2002. p. 573-679.
141. Cervera C, Fernández-Ruiz M, Valledor A, Linares L, Antón A, Ángeles Marcos M, Sanclemente G, et al. Epidemiology and risk factors for late infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2011; 13: 598-607.
142. Pérez-Ordoño L, Hoyo I, Sanclemente G, Ricart MJ, Cofan F, Pérez-Villa F, et al. Late-onset *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2014; 16: 324-8.
143. Meyer TW, Hostetter TH. Uremia. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1316-25.
144. Vanholder R, De Smet R, Lameire NH. Redesigning the map of uremic toxins. *Contrib Nephrol*. 2001; 133: 42-70.
145. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr*. 2012; 22: 149-56.
146. Sezer S, Ozdemir N, Güz G, Turan M, Arslan S, Haberal M. Immunologic profile of end-stage renal failure patients. *Transplant Proc*. 1999; 31: 3359-60.
147. Donati D, Degiannis D, Homer L, Gastaldi L, Raskova J, Raska K Jr. Immune deficiency in uremia: interleukin-2 production and responsiveness and interleukin-2 receptor expression and release. *Nephron*. 1991; 58: 268-75.
148. Li G, Yu M, Lee WW, Tsang M, Krishnan E, Weyand CM, et al. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity. *Nat Med*. 2012; 18: 1518-24.



149. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol.* 2005; 174: 7446-52.
150. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21: 414-7.
151. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Kaplan B. Exponentially increased risk of infectious death in older renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2001; 59: 1539-43.
152. Umpierrez GE, Kosiborod M. Inpatient dysglycemia and clinical outcomes: association or causation? *J Diabetes Complications.* 2014; 28: 427-9.
153. Dalrymple LS, Katz R, Kestenbaum B, de Boer IH, Fried L, Sarnak MJ, et al. The risk of infection-related hospitalization with decreased kidney function. *Am J Kidney Dis.* 2012; 59: 356-63.
154. James MT, Quan H, Tonelli M, Manns BJ, Faris P, Laupland KB, et al. CKD and risk of hospitalization and death with pneumonia. *Am J Kidney Dis.* 2009; 54: 24-32.
155. Wu MY, Hsu YH, Su CL, Lin YF, Lin HW. Risk of herpes zoster in CKD: a matched-cohort study based on administrative data. *Am J Kidney Dis.* 2012; 60: 548-52.
156. Serban G, Whittaker V, Fan J, Liu Z, Manga K, Khan M, et al. Significance of immune cell function monitoring in renal transplantation after Thymoglobulin induction therapy. *Hum Immunol.* 2009; 70: 882-90.
157. Vittoraki AG, Boletis JN, Darema MN, Kostakis AJ, Iniotaki AG. Adenosine triphosphate production by peripheral blood CD4<sup>+</sup>T cells in clinically stable renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2014; 46: 108-14.
158. Sousa SR, Galante NZ, Barbosa DA, Pestana JO. Incidence of infectious complications and their risk factors in the first year after renal transplantation. *J Bras Nefrol.* 2010; 32: 75-82.
159. Dizdar OS, Ersoy A, Akalin H. Pneumonia after kidney transplant: incidence, risk factors, and mortality. *Exp Clin Transplant.* 2014; 12: 205-11.
160. Lee YM, Kim YH, Han DJ, Park SK, Park JS, Sung H, et al. Cytomegalovirus infection after acute rejection therapy in seropositive kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2014; 16: 397-402.
161. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011; 12: 492-9.

162. Muñoz P. Management of urinary tract infections and lymphocele in renal transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (Suppl 1): S53-7.
163. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH. Urinary tract infection in the immunocompromised host. Lessons from kidney transplantation and the AIDS epidemic. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; 11: 707-17.
164. Anderson RU. Urinary tract infections in compromised hosts. *Urol Clin North Am*. 1986; 13: 727-34.
165. Neofytos D, Kobayashi K, Alonso CD, Cady-Reh J, Lepley D, Harris M, et al. Epidemiology, risk factors, and outcomes of *Clostridium difficile* infection in kidney transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2013; 15: 134-41.
166. Keven K, Basu A, Re L, Tan H, Marcos A, Fung JJ, et al. *Clostridium difficile* colitis in patients after kidney and pancreas-kidney transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2004; 6: 10-4.
167. Stelzmueller I, Goegele H, Biebl M, Wiesmayr S, Berger N, Tabarelli W, et al. *Clostridium difficile* colitis in solid organ transplantation--a single-center experience. *Dig Dis Sci*. 2007; 52: 3231-6.
168. Albright JB, Bonatti H, Mendez J, Kramer D, Stauffer J, Hinder R, et al. Early and late onset *Clostridium difficile*-associated colitis following liver transplantation. *Transpl Int*. 2007; 20: 856-66.
169. Origüen J, Fernández-Ruiz M, Lumbreras C, Orellana MÁ, López-Medrano F, Ruiz-Merlo T, et al. Potential role of post-transplant hypogammaglobulinemia in the risk of *Clostridium difficile* infection after kidney transplantation: a case-control study. *Infection*. 2015. [Epub ahead of print]
170. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 848-55.
171. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecová M, Klaboch J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008; 8: 69-77.
172. Freeman RB Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant*. 2009; 9: 2453-8.

173. Leung Ki EL, Venetz JP, Meylan P, Lamothe F, Ruiz J, Pascual M. Cytomegalovirus infection and new-onset post-transplant diabetes mellitus. *Clin Transplant*. 2008; 22: 245-9.
174. Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2009; 87: 436-44.
175. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, Wiesner RH, Velosa JA, Habermann TM, et al. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis*. 1995; 20: 1346-53.
176. Schnitzler MA, Lowell JA, Hardinger KL, Boxerman SB, Bailey TC, Brennan DC. The association of cytomegalovirus sero-pairing with outcomes and costs following cadaveric renal transplantation prior to the introduction of oral ganciclovir CMV prophylaxis. *Am J Transplant*. 2003; 3: 445-51.
177. Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 840-6.
178. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*. 2004; 66: 329-37.
179. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Díaz-Pedroche C, López-Medrano F, Lizasoain M, et al. Incidence, clinical characteristics and risk factors of late infection in solid organ transplant recipients: data from the RESITRA study group. *Am J Transplant*. 2007; 7: 964-71.
180. Andrikopoulou E, Mather PJ. Current insights: use of Immuknow in heart transplant recipients. *Prog Transplant*. 2014; 24: 44-50.
181. Dharnidharka VR, Hesemann LE. The Immuknow assay--does it really put us in the know about the immune system? *Pediatr Transplant*. 2014; 18: 415-6.
182. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis*. 2007; 9: 165-70.

183. Manuel O. Clinical Experience with Immune Monitoring for Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplant Recipients. *Curr Infect Dis Rep*. 2013. [Epub ahead of print]
184. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis*. 2013; 56: 817-24.
185. Fernández-Ruiz M, Navarro D, López-Medrano F, San Juan R, Amat P, et al. Kinetics of CMV-specific cell-mediated immunity accurately stratifies the risk of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients not receiving antiviral prophylaxis. Poster presentado en el 13º Congreso de la Sociedad Catalana de Trasplante, Barcelona (España), 18-20 marzo 2015.
186. Hricik DE, Heeger PS. Minimization of immunosuppression in kidney transplantation. The need for immune monitoring. *Transplantation*. 2001; 72 (8 Suppl): S32-5.
187. Ashton-Chess J, Giral M, Souillou JP, Brouard S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? *Transpl Int*. 2009; 22: 110-9.
188. Errores en la estimación de medidas de asociación en estudios epidemiológicos. En: De Irala Estévez J. *Epidemiología aplicada*. Barcelona: Ariel Ciencias Médicas; 2004. p.257-346.
189. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanco G, Dreno B, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*. 1998; 351: 623-8.
190. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation*. 2004; 78: 557-65.

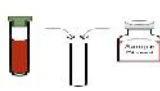


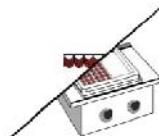
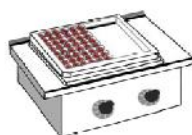
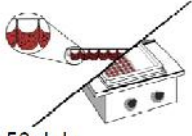
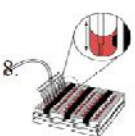
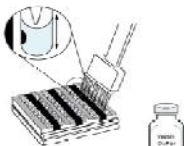
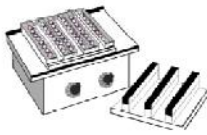


## **11. ANEXOS**

## 11. Anexos

**Anexo 1:** Guía rápida de ensayo para la realización del test ImmuKnow® aportada por el fabricante (Cylex™/Viracor-IBT laboratories)

# ImmuKnow™

## Guía Rápida de Ensayo

<p>1.</p> <p>Preparar la hoja de trabajo para comenzar el ensayo</p>	<p>2.</p>  <p>Diluir la sangre 1:4 (250 µl de sangre + 750 µl del diluyente)</p>	<p>3.</p>  <p>Añadir 25 µl de diluyente a los 4 primeros pocillos y 25 µl de estimulante en los 4 restantes.</p>	<p>4.</p>  <p>Añadir 100 µl del control diluido y de la sangre del paciente.</p>
<p>5.</p>  <p>Agitar la placa cubierta durante 30 segundos, Incubar de 15-18 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub></p>	<p>6.</p>  <p>Agitar la placa durante 3 minutos.</p>	<p>7.</p>  <p>Añadir 50 µl de Dynabeads®CD4, agitar la placa 15 segundos; incubar la placa 15 minutos a tª ambiente. Agitar la placa 15 segundos, incubarla 15 minutos más y agitar 15 segundos.</p>	<p>8.</p>  <p>Colocar las tiras en la placa magnética y esperar 1 min. y aspirar sin agitar las partículas.</p>
<p>9.</p> <p>Lavar la placa 3 veces (la pipeta llena y vertical)</p> <p>#1 Añadir 200 µl del Buffer de lavado, esperar 1 minuto y Aspirar.</p> <p>#2 Añadir 200 µl del Buffer de lavado, quitar los posibles restos de sangre, Aspirar.</p> <p>#3 Añadir 200 µl del Buffer de lavado, quitar la gradilla, agitar 1 minuto, colocar la gradilla en la base magnética, esperar 1 minuto, Aspirar.</p>		<p>10.</p>  <p>Añadir 200 µl del reactivo de Lisis</p>	<p>11.</p>  <p>Quitar la gradilla de la base magnética y agitar 5 minutos.</p>
<p>12.</p> <p>Colocar la gradilla en la base Magnética, esperar 1 minuto. Traspasar 50 µl desde la placa de ensayo a la placa de medición (en los correspondientes pocillos). Añadir 50 µl de cada calibrador en los pocillos correspondientes de la placa de medición.</p>		<p>13.</p>  <p>Añadir 150 µl de reactivo de luminiscencia (previamente homogeneizado) y agitar 30 seg.</p>	<p>14.</p> <p>Leer la placa entre los 3-10 min. posteriores a la adición de la luciferasa.</p>
<p>15.</p> <p>Calcular resultados y revisar análisis del control de calidad.</p>			

## Anexo 2: Consentimiento informado para el paciente.

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

- ✓ **Título del estudio:** MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CÉLULAS EN RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL: UTILIDAD DE UN TEST COMERCIAL ("ImmuKnow"<sup>®</sup> de Cylex<sup>TM</sup>) EN LA PREDICCIÓN DE COMPLICACIONES INFECCIOSAS POST-TRASPLANTE
- ✓ Investigador principal: **Mario Fernández Ruiz. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario "12 de Octubre"**
- ✓ Promotor del estudio: **Instituto de Investigación del Hospital Universitario "12 de Octubre"**
- ✓ Fuente de financiación: **Fundación Mutua Madrileña**

• **Objetivo/finalidad del estudio:** Sabemos que, al ser usted receptor de un órgano trasplantado, presenta más riesgo de padecer determinadas infecciones a lo largo de su evolución, en comparación con una persona sana. Estamos investigando los factores que aumentan la posibilidad de que ocurra dicha infección, y más concretamente, la influencia que pueda ejercer el estado de su sistema inmunitario ("las defensas del organismo") sobre su aparición. Por ello, solicitamos su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal es determinar el impacto de la situación inmunológica del receptor de un trasplante de riñón (medido a través de la concentración intralinfocitaria de ATP, recuento total de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica y recuento de inmunoglobulinas) sobre la incidencia y gravedad de la infección en el periodo post-trasplante. Si concede usted su consentimiento para participar en este estudio, procederemos a recoger determinados datos de su historia clínica y de las pruebas que le sean realizadas a lo largo del seguimiento. También solicitamos su permiso para que, al mismo tiempo que se le realizan las analíticas rutinarias programadas por su equipo médico, podamos extraer un volumen extra de 15 centímetros cúbicos de sangre en 4 ocasiones a lo largo de los 6 primeros meses tras la realización del trasplante. Analizaremos dichas muestras para determinar cuál es el estado de su sistema inmunitario.

• **Participación voluntaria:** Su participación en este estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que precise. La relación con el equipo médico que le atiende no va a verse en modo alguno afectada por la naturaleza de su decisión. Antes de tomar una decisión lea atentamente este documento y haga tantas preguntas como desee para asegurarse que lo ha entendido y desea participar.

• **Beneficios:** Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, la determinación de la situación inmunológica basal y evolutiva post-trasplante, y su influencia sobre la aparición de complicaciones infecciosas en situaciones como la suya, podría beneficiar en un futuro a otros pacientes igualmente sometidos a un trasplante de órgano sólido.

• **Compensación:** Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica por su participación.

• **Confidencialidad:** Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y tratada de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y Ley de Investigación Biomédica 14/2007. Para garantizar el anonimato de su identidad cada una de las muestras del estudio recibirá un código (nunca su nombre) y/o se anonimizarán. Se le ha pedido a su médico que guarde esta hoja de información con su consentimiento otorgado y su firma, así como la relación entre su código y su identidad en un archivo especial seguro que no forma parte de su historia clínica. Las conclusiones de este estudio podrían ser presentadas en reuniones y/o revistas científicas, pero siempre de forma global y sin que pueda identificarse individualmente a ninguno de los participantes.

• **Información adicional:** Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el investigador principal y/o otros investigadores del estudio.

• **Consentimiento Informado**

Yo, ..... declaro que  
(nombre y apellidos del paciente)

- ❖ He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- ❖ He recibido suficiente información
- ❖ He podido formular las preguntas que he considerado oportuna
- ❖ He hablado con (nombre del MEDICO)
- ❖ Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

-----  
Nombre (**paciente**)

Firma

Fecha

-----  
Nombre (**médico**)

Firma

Fecha



**Anexo 3: Informe del Comité de Ética y Ensayos Clínicos.**

Hospital Universitario  
12 de Octubre  
Comunidad de Madrid



Nº CEIC: **11/060**

### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACION CLINICA

Dña. MARIA UGALDE DIEZ, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doce de Octubre.

#### CERTIFICA:

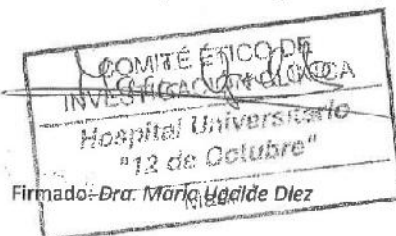
Que este Comité, en la reunión celebrada el día **10/05/2011**, ha analizado el Proyecto de Investigación titulado

**MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CÉLULAS EN RECEPTORES DE TRASPLANTE RENAL: UTILIDAD DE UN TEST COMERCIAL ("INMUKNOW"® DE CYLEX™) EN LA PREDICCIÓN DE COMPLICACIONES INFECCIOSAS POST-TRASPLANTE**

Cuyo Investigador Principal es el Dr. **Mario FERNANDEZ RUIZ**,  
Del Servicio de **UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios, este Comité **ACEPTA** que dicho proyecto sea realizado en este Centro.

Lo que firmo en Madrid, a 11 de mayo de 2011,



**Anexo 4:** *Comunicaciones en relación con la tesis*

- “Functional monitoring of cell-mediated immune response predicts the occurrence of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients” **MA. Pérez-Jacoiste**, M. Fernández-Ruiz , F. López-Medrano, C. Aquilino, R. San Juan, N. Polanco, A. Andrés, E. Paz-Artal, JM. Aguado. Póster. 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. ICAAC. September 5-9, 2014. Washington DC.
  
- “Monitoring of cell-mediated immune response through measurement of intracellular ATP in CD4+ T-cells predicts the occurrence of cytomegalovirus disease after kidney transplantation”. **MA. Pérez-Jacoiste Asín**, M. Fernández-Ruiz, F. López-Medrano, C.Aquilino, T. Ruiz-Merlo, R. San Juan, E. Gutierrez, E. Paz Artal, A. Andrés, JM Aguado. Póster. 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ECCMID. April 25-28, 2015. Copenhagen, Denmark.

# Functional Monitoring of Cell-Mediated Immune Response Predicts the Occurrence of Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients

M.A. PÉREZ-JACOISTE<sup>a</sup>, M. FERNÁNDEZ-RUIZ<sup>a</sup>, F. LÓPEZ-MEDRANO<sup>a</sup>, C. AQUILINO<sup>b</sup>, R. SAN JUAN<sup>a</sup>, N. POLANCO<sup>c</sup>, A. ANDRÉS<sup>c</sup>, E. PAZ-ARTAL<sup>b</sup>, J.M. AGUADO<sup>a</sup>

## INTRODUCTION

The Cylex<sup>™</sup> Immuknow<sup>®</sup> assay measures intracellular ATP (iATP) levels in CD4+ T-cells following non-specific stimulation as a functional marker of the post-transplant cell-mediated immunity (CMI).

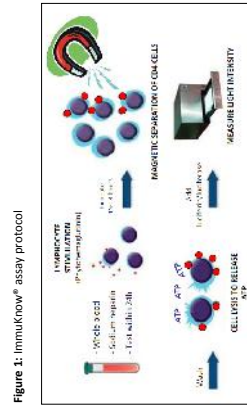
Previous studies have shown poor accuracy of this assay for predicting the overall risk of infection after kidney transplantation (KT) when this outcome is analyzed as a whole, regardless of the causative agent and the role of the CMI in its pathogenesis.

## METHODS

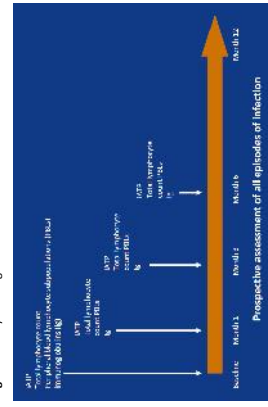
We prospectively enrolled 100 patients undergoing KT at our center between December 2011 and March 2013. All the patients were followed for at least 9 months, unless death or graft loss occurred earlier. Infectious events developed since the moment of transplantation were prospectively assessed.

iATP levels were measured by the Immuknow<sup>®</sup> assay according to manufacturer's instructions (**Figure 1**). Monitoring was performed following a pre-established schedule (at baseline and months 1, 3 and 6 after transplantation (**Figure 2**)).

iATP data were analyzed using previously proposed cutoff values (strong [  $\geq 525$  ng/ml], moderate [226-524 ng/ml] or low responses [  $\leq 225$  ng/ml]) and as a continuous variable.



**Figure 2: Study chronogram**



**Table 2: Non infectious events throughout the study period**

Type	N (%)
Acute graft rejection ≥ 2 episodes	23 (73)
Graft loss	5 (5)
Transplantectomy	2 (2)
Die from malignancy (including non-melanoma skin cancer)	3 (7)
Die from post-transplant diabetes mellitus	9 (9)

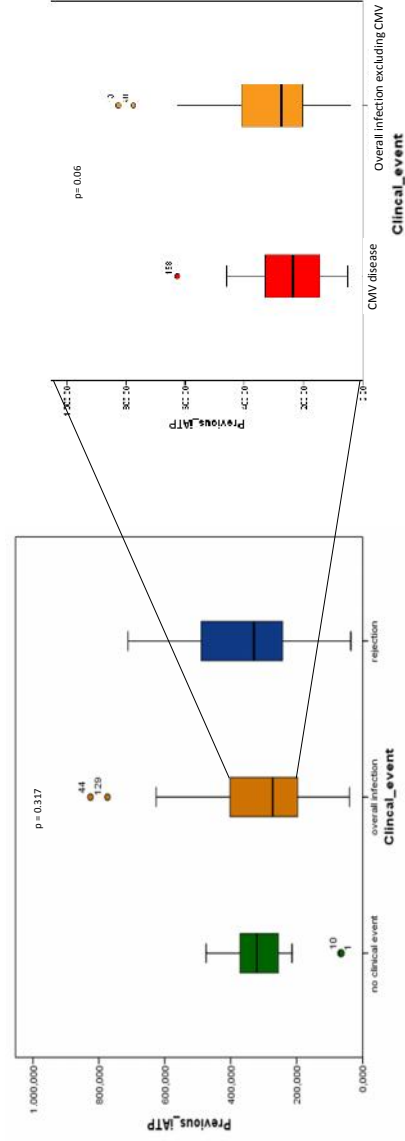
**Table 1:** Clinical syndromes and agents involved in 172 episodes of infection throughout the study period

Type	N (%)
<b>Bacterial infection</b>	
Genitourinary tract infection	52 (30.2)
Cystitis	20 (11.6)
Acute pyelonephritis	3 (1.7)
Epididymo-orchitis	
Diarrhea	14 (8.1)
<i>Clostridium difficile</i>	2 (1.2)
Other agents	3 (1.7)
Intraabdominal infection	
Respiratory tract infection	3 (1.7)
Pneumonia	3 (1.7)
Acute bronchitis	2 (1.2)
Skin and soft tissue infection	17 (9.9)
Surgical site infection	14 (8.1)
Primary blood stream infection	2 (1.2)
Catheter related blood stream infection	4 (2.3)

**Table 3:** Overall infectious episodes, bacterial infectious episodes and CMV disease episodes (including viral syndrome) during the intermediate post-transplant period (months 2-6) according to IATP values in month 1.

	IATP values in the first month			p value
	≤225 ng/ml (low response)	225-524 (moderate response)	≥525 (high response)	
Infection in the interme-diate period (months 2-6)				
Overall infection	9 (52.9%)	18 (56%)	6 (31.3%)	p=0.305
Bacterial infection (excluding UTI)	7 (41.2%)	7 (14%)	5 (76.3%)	p 0.053
UTI disease	5 (35.3%)	7 (14%)	1 (5.3%)	p=0.041
UTI urinary tract infection				

**Figure 4:** iATP values previous to overall infectious episode, rejection episode or no clinical event.



**Figure 5:** iATP values previous to bacterial infectious episodes and CMV disease episodes (including viral syndrome).

## CONCLUSIONS

The functional assessment of post-transplant cellular mediated immunity through the measurement of specific cut off values. The accuracy of the Immuknow® may be improved using agent specific cut off values. recipients.

## INTRODUCTION

The Cylex<sup>™</sup> Immuknow<sup>®</sup> assay measures intracellular ATP (iATP) levels in CD4<sup>+</sup> T-cells following non-specific mitogen stimulation as a functional marker of the post-transplant cell-mediated immunity (CMI).

Previous studies have shown poor accuracy of this assay for predicting the overall risk of infection after KT when this outcome is analyzed as a whole, regardless of the causative agent and the role of the CMI in its pathogenesis. The aim of this study was to evaluate the specific role of iATP monitoring to predict the occurrence of CMV disease, in which pathogenesis the CMI status is directly involved.

## METHODS

We prospectively enrolled 100 patients undergoing KT at our center between December 2011 and March 2013. All the patients were followed for at least 9 months, unless death or graft loss occurred earlier.

iATP levels were measured by the Immuknow<sup>®</sup> assay according to manufacturer's instructions (Figure 1). Monitoring was performed following a pre-established schedule (at baseline and months 1, 3 and 6 after transplantation) (Figure 2). iATP was analyzed as a continuous variable.

Infectious events (overall infection, bacterial infection and CMV disease) occurring within the first 45 days following each iATP monitoring point were recorded. We calculated the areas under the receiver operating curves (AUROC) for predicting each of these events. In the case of CMV disease, the cut-off value of iATP with optimal sensitivity and specificity was specifically estimated.

Figure 1: Immuknow assay protocol

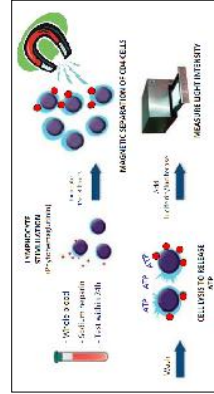
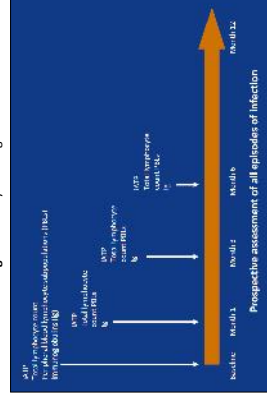


Figure 2: Study chronogram



## RESULTS

Figure 3: Comparison between mean iATP levels at the monitoring point prior to the occurrence of any infection, acute graft rejection or no event.

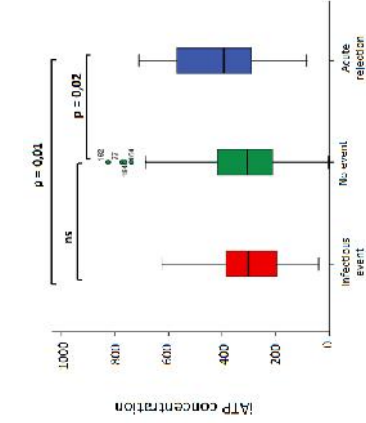


Figure 4: Comparison between mean iATP levels at the monitoring point prior to the occurrence of CMV disease, bacterial infection or no event.

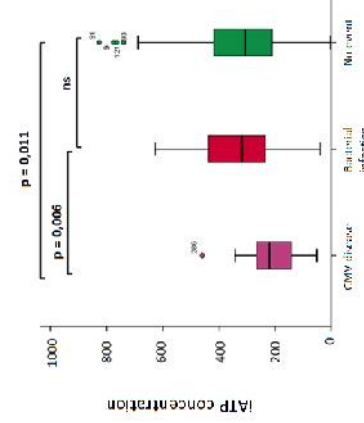


Table 1: Demographic and clinical characteristics of the patients included in the study (n = 100).

Variable	N	(%)
Age of recipient, years (mean $\pm$ SD)	52.9 $\pm$ 16.9	(39)
Gender (male)	59	(59)
Pre-transplant comorbidities		
Diabetes mellitus	13	(13)
Heart disease	14	(14)
Chronic liver disease	4	(4)
Chronic lung disease (COPD, asthma, OSA)	10	(10)
Previous vascular disease	3	(3)
Previous solid organ transplantation	18	(18)
History of underlying STD	22	(22)
General anaesthetics	23	(23)
Diabetes mellitus	8	(8)
Hypertension	15	(15)
Polyps	8	(8)
Chronic interstitial nephropathy	8	(8)
Unkown	16	(16)
Recipient serology		
Hepatitis B virus (HBsAg positive)	0	(0)
Hepatitis C virus	2	(2)
CMV status D+/R-	74	(74)
CMV status D+/R+	16	(16)
CMV status D-/R-	8	(8)
CMV status D-/R+	0	(0)
Pre-transplant renal replacement therapy	96	(96)
Hemodialysis	92	(92)
Continuous ambulatory peritoneal dialysis	14	(14)
Age of donor, years (mean $\pm$ SD)	52.4 $\pm$ 16.4	
Type of donor		
Deceased	54	(54)
Non heart beating donor	46	(46)
Living donor	0	(0)
Number of HLA matches (mean $\pm$ SD)	5 (4-5)	
Cole factor (mean $\pm$ SD)	16.3 $\pm$ 6.2	
Primary immunosuppression scheme		
Tacrolimus + MMF	7	(7)
Tacrolimus + MMF + prednisone	82	(82)
Tacrolimus + MMF + prednisone + cyclosporine	1	(1)
Tacrolimus + cyclosporine + prednisone	13	(13)
Tacrolimus + cyclosporine + prednisone + sirolimus		
Induction therapy		
None	13	(13)
Anti-thymocyte globulin	76	(76)
Rituximab	28	(28)
Anti-CD3 monoclonal antibody (muromonab)	6	(6)
CMV prophylaxis	57	(57)

Abbreviations: STD: sexually transmitted disease; OSA: obstructive sleep apnea; HBsAg: hepatitis B surface antigen; D: donor; R: recipient; MMF: mycophenolate mofetil; B: bacterial infection; STD: standard deviation.

**Funding sources:** FIS 12/02269, ISCIII, MINECO and Fundación Mutua Madrileña (FMM 2011.0082)



## CONCLUSION

The functional assessment of post-transplant CMI through the measurement of iATP levels could be useful in stratifying the risk of CMV disease in KT recipients. The prognostic accuracy of the Immuknow<sup>®</sup> assay may be improved by using agent-specific cut-off values.

Figure 5: Area under the ROC curve of iATP levels for predicting the occurrence of bacterial infection within the first 45 days following each monitoring point.

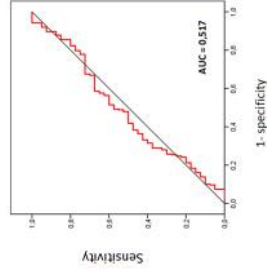
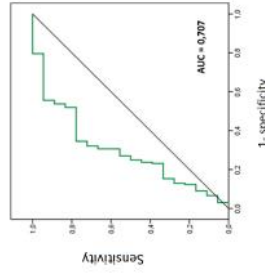


Figure 6: Area under the ROC curve of iATP levels for predicting the occurrence of an episode of CMV disease within the first 45 days following each monitoring point.



**Optimal iATP cut-off value of iATP for predicting CMV disease: 265 ng/mL**

Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
72.2%	65.5%	10.2%	97.8%

**Odds ratio per unitary increment of iATP (adjusted for D/R serostatus and use of antiviral prophylaxis):**

0.994, CI 95%: 0.950-0.999, P-value = 0.026

## **12. SUMMARY**

## 12. Summary

### Title

“Usefulness of the measurement of intracellular adenosine-triphosphate (iATP) produced by phytohemagglutinin-stimulated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes to predict infection in kidney transplant recipients”

### Background

Infectious complications remain a leading cause of morbidity and mortality after solid organ transplantation (SOT). They depend on the ‘net state of immunosuppression’ that emerges from a complex interaction between multiple factors, including the type of immunosuppression regimen used, its timing and dosage, the presence of underlying immune defects or viral infections, and the evolution of the graft function. Until now, clinicians who take care of SOT recipients have relied almost exclusively on the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs to explore the state of immunocompetence of their patients. However, this approach is limited because it does not take into account the influence of pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical variables. Currently, the optimal objective measurement of ‘net state of immunosuppression’ is lacking. There is a need for the accurate quantification of this state to predict the development of infectious syndromes.

The measurement of iATP levels in peripheral blood CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes following their non-specific stimulation with phytohemagglutinin (PHA), through the commercial assay Immuknow<sup>®</sup>, was approved by US Food and Drug Administration for detecting cell-mediated immunity in immunosuppressed patients. A population-based study comparing the assay results in healthy controls and SOT recipients established three categories to define the

patient's cell-mediated immune response: strong ( $\geq 525$  ng/ml), moderate (226 to 524 ng/ml) and low ( $\leq 225$  ng/ml).

Numerous authors have analysed the predictive value of iATP measurement for infection in SOT recipients with inconclusive results. Nevertheless, these studies display great diversity in terms of patient recruitment, frequency of iATP monitoring and duration of the follow-up. A limitation shared by numerous studies lies in the indication for the testing triggered by the clinical suspicion of a complication, which can bias the attribution of causality, as the pathogen itself may be responsible for lowering iATP levels through mechanisms of T-cell exhaustion. Of note, other limitation is that most studies analyze post-transplant infection as an overall outcome, regardless of the nature of the causative microorganism. Since the contribution of T-cell responsiveness, measured by iATP contributions, in controlling the infectious process differs according to the nature of the pathogen, it is likely that the actual predictive value of the assay may be underestimated.

## **Objectives**

The primary aim of this study was to evaluate the usefulness of a scheduled monitoring of cell-mediated immunity, through the measurement of iATP produced by CD4<sup>+</sup> T-cells stimulated with PHA, to predict infectious complications after kidney transplantation.

The secondary aim was to evaluate the specific role of iATP monitoring to predict the occurrence of cytomegalovirus disease, in which pathogenesis the cell-mediated immunity is directly involved.

## Material and methods

### *Study population and setting*

We conducted a prospective cohort study at the University Hospital “12 de Octubre” (Madrid, Spain), a tertiary-care center where about 150 kidney transplant (KT) procedures are performed annually. From December 2011 to March 2013 all consecutive patients aged 18 years or older who underwent single or double KT at our institution were included in a prospective immune status assessment, as detailed below. We excluded patients with known primary immunodeficiency syndromes (i.e., common variable immunodeficiency), human immunodeficiency virus (HIV) infection with a CD4<sup>+</sup> T-cell count <0.5 x 10<sup>3</sup> cells/ $\mu$ L, those undergoing simultaneous pancreas-kidney transplantation, those with primary graft non-function, and those who died or developed graft loss requiring graft removal within the first week. The local Clinical Research Ethics Committee approved the study protocol and written informed consent was obtained from all participants.

### *Study design*

Patients were enrolled at the moment of the transplantation and followed for at least 12 months, unless death or graft loss with definitive return to dialysis occurred before. All patients underwent an immune status assessment at scheduled times that included the measurement of intracellular adenosine triphosphate (iATP) levels in CD4<sup>+</sup> T-cells following non-specific stimulation (Cylex™ “ImmuKnow”® assay) and total lymphocyte and peripheral blood lymphocyte subpopulations (PBLs) counts. Blood samples were systematically collected at baseline (just before transplantation) and at months 1, 3 and 6 after transplantation. The primary study outcome was the occurrence of any infectious episode, excluding asymptomatic bacteriuria and asymptomatic cytomegalovirus (CMV) viremia. All the episodes of infection were prospectively collected by an Infectious Diseases specialist or a Nephrologist, both of them unaware of the patient’s immunological status.



### *Immune function assays*

Measurement of iATP levels was performed within 6 hours of sampling by means of the Cylex™ “ImmuKnow”® assay (Cylex Inc, Columbia, MD) and according to the manufacturer’s instructions. Briefly, 250 µL of anticoagulated whole blood were diluted with sample diluent (RPMI1640), added to wells of a 96-well microtiter plate, and incubated for 15-18 hours with phytohemagglutinin (PHA) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Next, CD4<sup>+</sup> T-cells were positively selected within the microwells using magnetic particles coated with anti-human CD4 monoclonal antibodies and a strong magnet (Cylex Cat. 1050) and washed to remove residual cells. A lysing reagent was then added to release iATP, which was measured by a luciferin-luciferase chemiluminescence assay with a luminometer (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA). The amount of light produced was proportional to the concentration of iATP expressed in ng/mL.

### *Definitions*

CMV disease included viral syndrome (defined by the demonstration of CMV infection by pp65 antigenemia plus one or more of the following: fever, new-onset or increased malaise, leukopenia, atypical lymphocytosis, thrombocytopenia, or elevation of ALT or AST higher than two times the upper limit of normal) and probable or definitive end-organ disease, as previously defined.

### *Statistical analysis*

Quantitative data were shown as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) or the median with interquartile ranges (IQR). Qualitative variables were expressed as absolute and relative frequencies with 95% confidence intervals (CIs). Normality of distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov test. Categorical variables were compared using the  $\chi^2$  test or Fisher’s exact test, as appropriate, whereas Student’s t-test or Mann-Whitney U test were applied for continuous variables. iATP levels were considered as a continuous variable and compared according to the occurrence of an infectious event in the first 45 days following each monitoring point. Patients were labelled stable when no infection was diagnosed within such period. Areas under receiver operating characteristics curves (auROCs) were constructed to

test the performance of iATP values in predicting the subsequent occurrence of infection. Univariate and multivariate (backward conditional selection) Cox regression models were used to evaluate the association between iATP values and study outcomes, with results expressed as hazard ratios (HR) with 95% CIs. All the significance tests were two-tailed. Statistical analysis was performed using SPSS version 20.0 (Statistical Package for Social Sciences Inc, Chicago, IL) and EPIDAT version 3.1 (Conselleria de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain).

## Results

A total of 100 kidney-transplant (KT) recipients were included, according to the inclusion criteria, with a median duration of follow-up of 564 days (Q1-Q3: 464.0-646.8). The mean age of the KT recipients was 52.94 years (SD=16.68) and 59% were males. The CMV serostatus was D+/R+ in 76 patients, D-/R+ in 16 and D+/R- or *mismatch* in 8 patients. 87 of the KT recipients received induction therapy, 67.8% with antithymocyte globulin.

Measurement of iATP was performed in a total of 359 monitoring points. Eight determinations were finally excluded due to the occurrence of both an episode of rejection and an episode of infection in the first 45 days after the same monitoring point. Overall, 67 infectious events occurred within the first 45 days following each monitoring point, including 49 episodes of bacterial infection and 18 episodes of CMV disease (including 11 viral syndrome and 7 tissue-invasive disease). There were no statistically significant differences in median iATP levels in patients who subsequently developed overall or bacterial infection as compared to those who did not develop such events [303.65 ng/ml (SD=146.45) vs 320.34 ng/mL (SD=158.3), p-value=0.434; and 333.1 ng/ml (SD=150.40) vs 320.34 ng/mL (SD=158.31), p-value=0.602, respectively]. However, mean iATP levels were significant lower in those patients who developed CMV disease (223.44 ng/ml (SD=100.43) vs 320.34 ng/mL (SD=158.31), p-value=0,011).

The auROC derived from iATP levels were 0,543 (IC 95%: 0.468-0.619; p-value=0.272) for predicting overall infection, AUC-ROC: 0.517 (IC 95%: 0.423-0,611; p-value=0.732) for predicting bacterial infection, and 0,707 (IC 95%: 0.611-0.804; p=0.003) for predicting CMV disease. The optimal iATP cut-off value for predicting CMV disease was 265 ng/mL, yielding a sensitivity of 72.22%, a specificity of 65.47%, a positive predictive value of 10.16% and a negative predictive value of 97.76%.

After adjusting for D+/R- serostatus, the use of antiviral prophylaxis, the use of antithymocyte globulin, and the age of the receptor, the iATP-value in the first month after the KT was indepently associated with the development of CMV disease in the next 5 months, with a *hazard ratio* per 50 ng/ml increment of iATP-value of 0.816 (IC 95% 0.674-0.988).

## Conclusions

The functional assessment of post-transplant cellular immunity through the measurement of iATP levels is useful in predicting the risk of CMV disease in the 45 days following its measurement in KT recipients. However, it is not useful in predicting the risk of other bacterial infections. The prognostic accuracy of the ImmuKnow® assay is improved by using agent-specific cut-off values.